

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universität Mainz
Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg

**Zum Stoffwechsel- und Adsorptionsverhalten
nativer und hitzedenaturierter
Plasmaproteine**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Gustav Georg Belz
geboren in Wiesbaden-Biebrich

Mainz 1967

1968

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universität Mainz
Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg

**Zum Stoffwechsel- und Adsorptionsverhalten
nativer und hitzedenaturierter
Plasmaproteine**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Gustav Georg Belz
geboren in Wiesbaden-Biebrich

Mainz 1967



Dekan:	Prof. Dr. Diethelm
Referent:	Privatdozent Dr. Gramlich
Korreferent:	Prof. Dr. R. Duesberg
Tag der mündl. Prüfung:	3. Februar 1968

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite	1
Methode	"	2 - 8
1. Gewinnung des Kaninchenserums	"	2
2. Präparation von Kaninchen - Albumin und -Gamma-Globulin	"	2
3. ^{131}Jod -Markierung der Proteine	"	2 - 3
4. Aktivitätsmessungen	"	3
5. Gehalt der Proteinlösungen an ungebundenem ^{131}Jod	"	4
6. Entfernung des nicht-protein-gebundenen $^{131}\text{Jods}$	"	4
7. Denaturierung der Proteine	"	4
8. Intravenöse Applikation der nativen und denaturierten Proteine an Kaninchen	"	5
9. Entnahme der Blutproben	"	6
10. Auswertung der Meßdaten	"	6
11. Gewinnung der Erythrozyten	"	7
12. Vergleichswert Aktivkohle	"	7
13. Beladung der Erythrozyten mit Albumin	"	7
14. Beladung der Aktivkohle mit Albumin	"	7
15. Beladung der Erythrozyten mit Gamma-Globulin	"	7
16. Beladung der Aktivkohle mit Gamma-Globulin	"	7
17. Entfernung der nicht adsorbier-ten ^{131}Jod -Proteine	"	8
Ergebnisse	"	9 - 20
A. Ergebnisse der in vivo Versuche	"	9 - 16
1. Prozent - Zeit - Funktion	"	9
2. Logarithmus - Zeit - Funktion	"	9
3. Ermittlung der Halbwertszeit der Proteine	"	9
4. Halbwertszeit - Denaturierungszeit - Funktion	"	10

a) Die Ergebnisse der Gamma-Globulin Tierversuche bei Denaturierungstemperatur 65°C	Seite	10 - 12
b) Die Gamma-Globulin -Versuche bei Denaturierungstemperatur 75°C	"	12
c) Die Ergebnisse der Albumin-Tierversuche bei Denaturierungstemperatur 65°C	"	12 - 13
d) Die Ergebnisse der Albumin-Tierversuche mit Denaturierungstemperatur 75°C	"	14 - 16
e) Zusammenfassung der Ergebnisse der in vivo-Versuche	"	16
B. Ergebnisse der in vitro-Versuche	"	17 - 20
a) Die Ergebnisse der Gamma-Globulin-Beladungsversuche		
1. Die Adsorption an Erythrozyten		
I. Denaturierungstemperatur 60°C	"	17
II. Denaturierungstemperatur 65°C	"	17
III. Denaturierungstemperatur 70°C	"	18
2. Die Adsorption an Aktivkohle		
I. Denaturierungstemperatur 60°C	"	18
II. Denaturierungstemperatur 65°C	"	18
III. Denaturierungstemperatur 70°C	"	18
b) Die Ergebnisse der Albumin-Beladungsversuche		
1. Die Adsorption an Erythrozyten		
I. Denaturierungstemperatur 70°C	"	19
II. Denaturierungstemperatur 75°C	"	19
III. Denaturierungstemperatur 80°C	"	19

2. Die Adsorption an Aktivkohle		
I. Denaturierungstemperatur 70°C	Seite	19
II. Denaturierungstemperatur 75°C	"	19
III. Denaturierungstemperatur 80°C	"	20
c) Zusammenfassung der Ergebnisse der in vitro-Versuche	"	20
Diskussion	"	21 - 27
Zusammenfassung	"	28

Einleitung

Den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen bildete die Feststellung W. Hitzigs (4), daß im Gegensatz zum Anabolismus der Plasmaproteine der Katabolismus dieser Stoffe nur wenig untersucht sei.

Wir hatten uns die Aufgabe gestellt, den Abbau von Albumin und Gamma-Globulin im Tierversuch an Kaninchen zu untersuchen. Wir verwendeten hierzu einmal natives ¹³¹Jod-markiertes Albumin und Gamma-Globulin, zum anderen stufenweise Hitze-denaturiertes Substrat. Die Hitze-denaturierung führten wir unter dem Gesichtspunkt durch, daß auch im Organismus vor dem Katabolismus der Proteine Veränderungen in der Molekülstruktur derselben einträten, die wir durch die stufenweise Denaturierung zu imitieren hofften.

Parallel zu den in vivo Versuchen untersuchten wir die Adsorption der selben Proteine und ihrer Denaturierungsstufen an Erythrozyten und Aktivkohle. Dabei waren wir von der Fragestellung ausgegangen: Wie sucht der Organismus die Proteine aus, die abgebaut werden? Sollten bei der Selektion Adsorptionsvorgänge eine Rolle spielen, so hofften wir, durch Gegenüberstellung von Adsorptionsverhalten und Halbwertszeit der Proteine gleiche Verhaltensweisen zu finden.

Im folgenden sollen die Ergebnisse unserer Untersuchungen geschildert werden.

Methode

1. Gewinnung des Kaninchenserums

Einem mit Evipan narkotisierten Tier wurde durch Herzpunktion Blut entnommen. Nach vollständiger Gerinnung wurde das Blut zentrifugiert und das Serum abgehoben.

2. Präparation von Kaninchen Albumin und Gamma-Globulin

Kaninchenserum wurde mit Dole Puffer (20,6 g Natrium-aethylbarbituricum, 3,6 g Acidum diaethylbarbituricum, aqua dest. ad 10 l) im Verhältnis 1 : 1 vermischt und mit Hilfe einer Präparationselektrophorese fraktioniert (Apparatur Fa. Beckman, Modell CP, angelegte Spannung 600 V; Durchfluß 4 ml/h bei 4° C). Die Reinheit der gewonnenen Chargen wurde papierelektrophoretisch überprüft, wobei sich jeweils Einzelbanden ergaben.

Die Eiweißkonzentration der Lösungen wurde mit der Biuret-Methode (Faktor 18,3) bestimmt, und ergab zunächst für die Jodierung zu geringe Konzentrationen (ca. 0,2 - 0,5 g%). Aus diesem Grunde wurde das Volumen beider Fraktionen im Vakuum-Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Schweiz) bei 35° C eingeengt. Die Endkonzentrationen wurden beim Albumin mit 5,77 g% und bei Gamma-Globulin mit 2,10 g% bestimmt.

3. ¹³¹Jod-Markierung der Proteine

Die ¹³¹Jodierung erfolgte in Anlehnung an die von Mc Farlane (5) angegebene Methode.

a) Lösungen

I. Zu 3 Volumender Proteinlösung wurden 2 Volum-Teile eines Glycin-Puffers (Lösung von 0,6 g Glycin in 8 ml einer 5,85 % NaCl-Lösung unter Zufügung von 2 ml n-NaOH) zugefügt.

II. Als Jodierungsgemisch wurden angesetzt:

2 Volum-Teile einer 0,9 % NaCl, in welcher der gewünschte Betrag an ¹³¹J in Form von trägerfreiem ¹³¹JNa gelöst war (bezogen vom Radiochemical Centre, England). In der Regel stand eine Gesamtaktivität von 10 mC zur Verfügung.

Es wurden 2 Volum-Teile einer 0,1 n-HJO₃ zugefügt. 5 Minuten vor der ¹³¹Jod-Markierung wurde diesem Gemisch zur Freisetzung des ¹³¹Jod 1 Volum-Teil einer 0,01 n-HCl zugefügt.

Dann wurden gleiche Volumina der Gemische I und II zusammengebracht.

b) ¹³¹Jodierung in der Jet-Misch-Apparatur

Zur Durchführung der Markierung wurde die von Mc Farlane (5) angegebene Jet-Misch-Apparatur verwendet. Diese besteht aus einem System von zwei Büretten, von denen die eine 5 ml, die andere 10 ml faßt. Beide sind durch eine konzentrische Freisetzungsdüse verbunden (Abb. 1). Zuerst wurde die aktive ¹³¹Jodlösung (Gemisch II) in die kleine Bürette aufgezogen. Sodann die Proteinlösung (Gemisch I) in einem kleinen Gefäß unter die Freisetzungsdüse gestellt. In einem Arbeitsgang wurde dann in der kleinen Bürette ein Überdruck und in der großen ein Unterdruck erzeugt. Dadurch wurden beide Gemische in die große Bürette übertragen, und im Jet optimal vermischt. Der Vorgang der Vermischung nahm 10 sec in Anspruch. Nachdem das ¹³¹Jod 10 min mit dem Protein in der großen Bürette reagiert hatte, wurde das Gemisch abgelassen und das freie Jod durch Zugabe von 1 Volum-Teil einer n-Na₂S₂O₃-Lösung wieder gebunden. Damit war der Jodierungsvorgang beendet. Es wurden stets mehrere Jodierungen nacheinander ausgeführt, da das Volumen eines Vorganges auf 10 ml begrenzt war.

4. Aktivitätsmessungen

Die Bestimmung der Gamma-Strahlung des ¹³¹Jods erfolgte in einem Szintillationszähler mit Bohrlochkristall (FH 421) der Fa. Friesecke & Höpfner, Erlangen. Mittlerer Messfehler ± 1 %. Die Geometrie der Meßanordnung blieb konstant. Koinzidenz und Halbwertszeiten wurden soweit erforderlich berücksichtigt.

5. Gehalt der Proteinlösungen an ungebundenem ^{131}Jod

Um zu erfahren, wieviel der angebotenen ^{131}Jod -Aktivität an das Protein gebunden wurde, bestimmten wir den Gehalt an freiem Jod. Es wurde zunächst die Aktivität von 0,01 ml des Gesamt-Gemisches bestimmt. Zur gleichen Menge wurde dann 2,99 ml einer konzentrierten Protein-Lösung (Normalserum) und dann 2,0 ml 20 % Trichloressigsäure zugefügt.

6. Entfernung des nicht-proteingebundenen $^{131}\text{Jods}$

Um das freie Jod zu binden, wurde die gesamte Charge durch eine Ionenaustauscher-Säule kolliert.

Vorbereitung der Säule: Eine 1,30 m hohe und 3 cm im Durchmesser messende Säule wurde unten durch einen lockeren Glaswollstopfen verschlossen. Dann wurde in einer 0,9 % NaCl-Lösung aufgeschwemmtes Amberlit (Fa. Serva, Heidelberg) bis zu einer Höhe von 1,20 m eingefüllt. Auch nach oben wurde die Säule durch einen Glaswollpfropfen verschlossen, so daß das Amberlit beim Aufgeben der Charge nicht aufwirbeln konnte. Dann wurde die Säule mit 2 - 3 l 0,9 % NaCl gewaschen. Die ^{131}Jod -Protein-Charge wurde nunmehr vorsichtig aufgegeben und soviel 0,9 % NaCl abgelassen, bis erstere völlig in den Austauscher eingezogen war. In der Kühlzelle wurde die Säule bei $+4^{\circ}\text{C}$ 12 Stunden stehen gelassen. Dann wurde tropfenweise abfraktioniert. Die meiste Aktivität befand sich in den ersten 120 ml. Nach dieser Behandlung betrug der Gehalt an freiem ^{131}Jod beim Albumin weniger als 1,46 % und beim Gamma-Globulin weniger als 1,63 % der Gesamtaktivität pro Volumen. Die Proteinkonzentrationen lagen nach der Säulenpassage bei 0,38 g% Albumin und 0,16 g% Gamma-Globulin.

7. Denaturierung der Proteine

Zunächst wurden die Proteinlösungen mit einem Phosphatpuffer (2,49 g NaH_2PO_4 + 8,62 g Na_2HPO_4 nach Sörensen, pH 7,2) vermischt. Die Denaturierung wurde definiert nach Temperatur (t) und Zeit (T) durchgeführt. Die eingestellte Temperatur wurde in einem Präzisionswasserbad sehr genau eingehalten. Als Denaturierungszeit galt die Zeit vom Eintauchen eines Reagenzglases mit Protein-

lösung bis zu dessen Herausnahme. Sie wurde mit einer Stoppuhr auf ± 1 sec eingehalten. Nach der Herausnahme aus dem Wasserbad wurden die Reagenzgläser sofort in Wasser von 20°C eingetaucht, um eine unkontrollierbare weitere Temperatureinwirkung zu verhindern. Im einzelnen waren die Zeiten und Temperaturen wie folgt:

Albumin: Für die in vivo-Versuche

a. $T = 75^{\circ}\text{C}$

$t = 0$ min (Nativwert), 10 min, 30 min,
40 min

b. $T = 65^{\circ}\text{C}$

$t = 0$ min, 1 min, 2 min, 15 min

Für die in vitro-Beladungen

$T = 70^{\circ}, 75^{\circ}, 80^{\circ}\text{C}$

$t = 0, 1, 3, 5, 10, 20$ Minuten

Gamma-Globulin:

Für die in vivo-Versuche

$T = 65^{\circ}\text{C}$

$t = 0, 1, 2, 15$ Minuten

Für die in vitro-Beladungen

$T = 60^{\circ}, 65^{\circ}, 70^{\circ}\text{C}$

$t = 0, 1, 3, 5, 10, 20$ Minuten

Durch die Temperatureinwirkung wurde der Anteil an freiem ^{131}Jod in den Proteinchargen nachweislich nicht erhöht.

In vivo - Versuche:

8. Intravenöse Applikation der nativen und denaturierten Proteine an Kaninchen

Für die Versuche verwendeten wir junge Kaninchen mit einem Körpergewicht zwischen 2.300 g und 3.200 g.

Beim Albumin der Denaturierungsstufe 75°C wurde jeweils eine Menge von 8,7 ml pro kg Körpergewicht der ^{131}Jod -Albumin Chargen injiziert, welche 2,23 Mill.

Imp/min/ml enthielten.

Beim Albumin der Denaturierungsstufe 65°C wurden je

kg Kaninchen 7,6 ml injiziert, welche 4,4 Mill.Imp./min/ml enthielten.

Beim Gamma-Globulin wurden 5,8 ml/kg Körpergewicht verabreicht mit einer Aktivität von 4,3 Mill.Imp./min/ml. Die Injektionen wurden in die rechte Ohrandvene vorgenommen. Jeder Wert wurde an drei Tieren abgesichert.

9. Entnahme der Blutproben

Die ersten 4 Blutproben wurden aus der linken Ohrandvene entnommen, darauffolgende jeweils wechselweise rechts und links. Die erste Blutentnahme erfolgte nach 4 Stunden, dann wurden in etwa 1-tägigem Rhythmus weitere Proben abgenommen, wie aus den Abbildungen ersichtlich ist.

Dabei wurde jeweils 1 ml Blut entnommen, welches nach der Gerinnung zentrifugiert wurde.

Vom Serum wurde die Aktivität in 0,1 ml bestimmt.

Weitere 0,1 ml wurden mit 0,2 ml Trichloressigsäure 20 % gefällt, zentrifugiert und die Aktivität von 0,1 ml des Überstandes gemessen. Hieraus ergab sich der Gehalt des Serums an ungebundenem ^{131}Jod . Zuletzt wurde mit 0,1 ml Serum die Proteinkonzentration mit der Biuret-Methode (Faktor 18,3) bestimmt.

10. Auswertung der Meßdaten

Die Aktivität von 0,1 ml Serum wurde auf 1 ml umgerechnet, desgleichen die Aktivität des freien Jods. Das freie Jod wurde von der Gesamtaktivität in Abzug gebracht, wodurch sich die Aktivität des proteingebundenen Jods ergab. Diese wurde auf den Proteingehalt bezogen, um Schwankungen desselben zu eliminieren. Es ergab sich als Dimension: Impulse pro Minute pro Milligramm Protein. Als Zeitpunkt Null wurde in der Darstellung der Zeitpunkt der ersten Entnahme 4 Stunden nach der Injektion festgesetzt. Auf diesen Zeitpunkt wurden auch die folgenden Werte mit Hilfe einer Zerfallstabelle (9) zurückgerechnet, um den physikalischen Zerfall des $^{131}\text{Jods}$ zu eliminieren. Bei der Prozent-Zeit-Funktion galt der erstermittelte Wert, also der Wert nach 4 Stunden als 100 Prozent.

In vitro - Versuche:

11. Gewinnung der Erythrozyten

Kaninchenblut wurde auf Kaliumoxalat aufgefangen und damit ungerinnbar gemacht. Das Erythrozytensediment wurde zentrifugiert und schließlich dreimal auf der Zentrifuge mit dem 10-fachen Volumen physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Sodann wurden die Erythrozyten auf einen Hämatokrit von 71 eingestellt, der willkürlich definiert war. (Hämatokritbestimmung 30 min bei 3.000 rpm in konventionellen Hämatokritröhrchen).

12. Vergleichswert Aktivkohle

Um einen Vergleich zu der Adsorption an Erythrozyten zu erhalten, wurden die Beladungsversuche in gleicher Weise, jedoch mit geringerer angebotener Aktivität mit Aktivkohle durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden in Zentrifugengläser je 20 mg Aktivkohle mit einer Genauigkeit $\pm 0,1$ mg eingewogen.

13. Beladung der Erythrozyten mit Albumin

Von den nach 10. gewonnenen Erythrozyten wurden je 2,0 ml in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Dazu kamen 2,5 ml natives bzw. denaturiertes ^{131}Jod -Albumin sowie 2,5 ml eines K-Na-Phosphat-Puffers (pH 7,2). Das Angebot betrug pro Ansatz 3.527.000 Imp/min.

14. Beladung der Aktivkohle mit Albumin

In die vorbereiteten Zentrifugengläser mit 20 mg Aktivkohle wurde eingegeben: 0,01 ml ^{131}Jod -Albumin und 4,99 ml des Phosphatpuffers. Das Angebot betrug 16.000 Imp/min je Ansatz.

15. Beladung der Erythrozyten mit Gamma-Globulin

Zu 1,5 ml Erythrozyten wurden 1,5 ml Gamma-Globulin (natives oder denaturiertes) und 3,5 ml Phosphatpuffer zugegeben. Das Angebot betrug pro Ansatz 4.985.000 Imp/min.

16. Beladung der Aktivkohle mit GammaGlobulin

In die Zentrifugengläser mit 20 mg Aktivkohle wurden gegeben: 0,05 ml Gamma-Globulin und 3,5 ml Phosphatpuffer.

Das Angebot betrug 49.500 Imp/min pro Ansatz.

Alle Beladungen 13. bis 16. wurden an vier Einzelwerten gesichert. Nach dem Einpipettieren des Proteins standen die Ansätze 1 Stunde bei Zimmertemperatur.

17. Entfernung der nicht adsorbierten ^{131}Jod -Proteine

Nach 1 Stunde wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Sediment auf 7 ml mit Phosphatpuffer aufgeschwemmt. Dann erfolgte erneutes Zentrifugieren. Insgesamt wurde 3-mal mit dem Puffer gewaschen, und zwar mit einem Volumen von ca. 20 ml. Am Schluß wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment im Zählrohr gemessen. Der ermittelte Wert wurde in Prozent der angebotenen Aktivität ausgedrückt.

Ergebnisse

A. Ergebnisse der in vivo-Versuche

Die ermittelten Werte wurden nach folgenden Schema ausgewertet:

1. Prozent-Zeit-Funktion:

Hierbei wurde auf der Ordinate der Gehalt an protein-gebundener Aktivität in Prozent des ersten ermittelten Wertes (4 Stunden nach Injektion) angegeben. Auf der Abszisse wurde die seit der Erstentnahme vergangene Zeit in Stunden aufgetragen. Die Untersuchung der Prozent-Zeit-Funktion ergab Aufschluß über die Kohärenz der Werte bei den jeweils 3 Versuchstieren, außerdem ließ sie besonders gut eine Analyse des Anfangsteils der Funktionen zu.

2. Logarithmus - Zeit - Funktion:

Bei dieser wurde auf der Ordinate der dekadische Logarithmus der Einzelwerte in $\lg \text{ Imp/min/mg-Protein}$ aufgetragen. Bei dieser Darstellung ergab sich nach einem initialen Abfall ein linearer Abstieg der Funktion. Im linearen Teil war die Steigung der Kurven annähernd konstant.

3. Ermittlung der Halbwertszeit der Proteine:

Konventionell wird unter der mittleren Halbwertszeit der Isotopen-markierten Proteine die Zeit verstanden, die vergeht, bis von einem angenommenen Wert der Aktivität diese auf die Hälfte sinkt. Hierbei wird der physikalische Zerfall vorher rechnerisch eliminiert. Die Halbwertszeiten hätten prinzipiell sowohl aus der Funktion 1 als auch 2 ermittelt werden können. Wir zogen jedoch wegen des linearen Verlaufes die Funktion 2 vor. Im einzelnen wurde die Ermittlung folgendermaßen durchgeführt: Von dem Logarithmus an, bei welchem die Funktion in eine annähernde Gerade einbog, bis zum Endwert wurde in Abständen von jeweils $(\lg) 0,5$ auf der Ordinate der $\lg 2 = 0,3010$ von den fixierten Werten subtrahiert. Die diesen Werten entsprechenden

Abszissen wurden aufgesucht. Die Länge der Strecke vom Lot der Ausgangsordinate auf die Abszisse und dem Lot des aufgesuchten Abszissenwertes ergab die Halbwertszeit im vorgewählten Abschnitt. Damit ergab sich im Durchschnitt eine Reihe von 7 Halbwertszeiten, deren Mittelwert als die mittlere Steigung d.h. die erste Ableitung der Funktion angesehen werden kann. Die Halbwertszeit ist damit also durch eine graphische Differenzierung der Funktion 2 ermittelt worden.

4. Halbwertszeit-Denaturierungszeit - Funktion

Zum Schluß wurde noch die Abhängigkeit der Halbwertszeit (nach 3) von der Denaturierungszeit dargestellt.

a) Die Ergebnisse der Gamma-Globulin-Tierversuche bei Denaturierungstemperatur 65°C

1. Es zeigte sich, daß nach einem Tag bei den nativen und bei den 1 und 2 min denaturierten Gamma-Globulinen nur noch 55 % des Ausgangswertes an Aktivität vorhanden war. Bei dem 15 Minuten denaturierten Wert waren noch 65 % der Aktivität übrig. Die Verläufe der Kurven sind annähernd exponentielle, d. h. die Funktionen nähern sich asymptotisch der x-Achse, wobei dann allerdings der letzte Teil nach 19 Tagen im Bereich der Fehler der Messung verschwindet.

Vom 3. Tag an verlaufen die Kurven fast gerade, so daß sich dieser Teil der Kurve für die Bestimmung der Halbwertszeit anbot (Abb. 2 - 5).

2. Aus den logarithmischen Funktionen ist weniger gut der initiale als der finale Abfall, der durch die Fehlerbreite der Methode bedingt ist, zu ersehen. Der Verlauf dieser Funktionen ist vom ersten Tag an sehr linear, so daß man sogar eine Extrapolation über die Werte des 16. Tages, an dem ja der fehlerbedingte Abfall eintrat, ohne weiteres vornehmen konnte. Sowohl bei der Funktion 1 als auch bei der Funktion 2 ist bei bloßem Betrachten ein Unterschied

zwischen den einzelnen Denaturierungszeiten nicht sofort augenfällig. (Abb. 6 - 9).

Dieser ergab sich erst in vollem Umfange bei der

3. Ermittlung der Halbwertszeit. Diese wurde wie gesagt aus der Funktion 2 vorgenommen, in der oben geschilderten Art und Weise.

Die Halbwertszeiten betrugen:

Nativwert:	Kaninchen 1	:	117 Stunden
	"	2	: 109 "
	"	3	: 123 "

Die mittlere Halbwertszeit der nativen Gamma-Globuline ergab sich also zu 116 Stunden.

1 min denaturiert:

	Kaninchen 4	:	103 Stunden
	"	5	: 76 "
	"	6	: 122 "

Der Mittelwert betrug 100 Stunden.

2 min denaturiert:

	Kaninchen 7	:	107 Stunden
	"	8	: 124 "
	"	9	: 92 "

Der Mittelwert betrug 108 Stunden.

15 min denaturiert:

	Kaninchen 10	:	158 Stunden
	"	11	: 129 "
	"	12	: 138 "

Der Mittelwert betrug 142 Stunden.

4. Halbwertszeit- Denaturierungszeit- Funktion (Abb. 10). Die ermittelten Halbwertszeiten sowie die Mittelwerte wurden in funktionellen Zusammenhang mit der Denaturierungszeit gebracht. Aus dieser Funktion ist folgendes zu sehen: Die mittlere Halbwertszeit wie auch die aller Einzelwerte nimmt bei kurzer Denaturierung von 1 min unter den Normalwert ab. Die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert

steigt von ± 7 Stunden beim Nativwert auf $+ 22$ Stunden und $- 24$ Stunden beim 1-min-Wert. Schon bei einer Denaturierungszeit von 2 min. ist jedoch in allen Werten ein Anstieg zu verzeichnen, der jedoch nicht den Normalwert erreicht. Die Streuung nimmt ab auf ± 16 Stunden. Bei der Denaturierungszeit von 15 min vollzieht sich dann ein starker Anstieg der Halbwertszeit, die mit keinem Wert in den Bereich der Normalwerte hineinragt. Die Fehlerstreuung beträgt hier $+ 16$ und $- 13$ Stunden. Die Einzelwerte überragen mit ∓ 35 , $+ 15$ und $+ 6$ Stunden den maximalen Normalwert. Der mittlere Wert liegt 26 Stunden über dem mittleren Nativwert.

b) Denaturierungstemperatur 75°C bei Gamma-Globulin-Versuchen

Versuche mit dieser Temperatur waren in Analogie zu den Albuminversuchen vorgesehen, konnten jedoch nicht ausgeführt werden, da bei der Temperatur von 75°C bereits Trübung und Flockung der Proteinchargen eintrat.

c) Die Ergebnisse der Albumin-Tierversuche mit Denaturierungstemperatur 65°C

1. Der Kurvenverlauf ist sehr ähnlich dem des Gamma-Globulin. Am ersten Tag ist auch hier der initiale Abfall beträchtlich. Am dritten Tag ist nur noch 50 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Es fällt auf, daß die Kurven weiter streuen als dies bei den Gamma-Globulinen der Fall war, jedoch ist auch hier zu ersehen, daß die Abfälle fast ausnahmslos synchron erfolgen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Denaturierungsstufen ist beim Betrachten dieser Funktionen nicht zu erkennen. (Abb. 11 - 14.)
2. In weit größerem Maße als in 1 ergibt sich der Zusammenhang der Einzelwerte (vor allem bei den Nativ- und 2 min-Werten). Schon nach dem ersten Tag ist der Verlauf der Kurven linear. Auch hier gilt, daß die wesentlichen Unterschiede sich erst beim Differenzieren der Funktionen ergeben. (Abb. 15 - 18).

3. Die Auswertung ergab folgende Halbwertzeiten:

Nativwert:	Kaninchen 1	:	149 Stunden
	"	2	: 183 "
	"	3	: 173 "

Die mittlere Halbwertzeit des nativen Kaninchenalbumins ergab sich also zu 168 Stunden.

1 min denaturiert:	Kaninchen 4	:	153 Stunden
	"	5	: 158 "
	"	6	: 193 "

Der Mittelwert betrug 168 Stunden.

2 min denaturiert:	Kaninchen 7	:	167 Stunden
	"	8	: 205 "
	"	9	: 166 "

Der Mittelwert betrug 179 Stunden.

15 min denaturiert:	Kaninchen 10	:	136 Stunden
	"	11	: 117 "
	"	12	: 164 "

Der Mittelwert betrug 139 Stunden.

4. Halbwertzeit-Denaturierungszeit-Funktion

Die in 3 ermittelten Halbwertzeiten wurden mit der Denaturierungszeit in funktionellen Zusammenhang gebracht (Abb. 19). Dabei ergab sich folgendes: Die Halbwertzeiten des nativen Albumins und des 1-min denaturierten sind fast identisch. Lediglich der höchste und der tiefste Wert lassen einen geringen Anstieg erkennen, der aber in der Streubreite der Bestimmung liegt. Nach 2 Minuten ist ein Anstieg aller Werte zu verzeichnen, der mit seinem Maximalwert von 205 Stunden den Maximalwert des nativen Proteins um 22 Stunden übertagt. Der Mittelwert liegt 11 Stunden über dem mittleren Nativwert. Nach 15 min Denaturierungszeit fallen dann alle Werte unter den Normalwert ab, der minimalste liegt 32 Stunden unter dem minimalsten Nativwert. Die mittlere 15 min-Halbwertzeit liegt mit 29 Stunden deutlich unter der der nicht denaturierten Albumine.

d) Ergebnisse der Albumin-Tierversuche mit Denaturierungstemperatur 75° C

1. Im Gegensatz zu den Verläufen von bei 65° C denaturierten Albumin und Gamma-Globulin ist hier der Unterschied zwischen den nativen und den denaturierten Albuminen sehr ausgeprägt (Abb. 20 - 23). Die denaturierten Proteine werden durchwegs schneller eliminiert als die nativen. Bei dem nativen Wert kommt es zu einem starken Initialabfall, nach 24 Stunden sind noch 50 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Bei dem Albumin von 10 min Denaturierungszeit ist nach der gleichen Zeit nur noch 30 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Bei der folgenden Stufe von 30 min nur noch 10 % und bei 40 min nurmehr wenig über Null %. Die Funktionen der drei ersten Stufen gehen nach 48 Stunden in einen mehr oder weniger linearen Verlauf über und nähern sich asymptotisch der x-Achse. Der Wert bei 40 min Denaturierungszeit zeigt ein etwas anderes Verhalten. Nach anfänglich starkem Abfall kommt es nach 24 Stunden zu einem erneuten Anstieg der Aktivität, die nach 48 Stunden dann wieder abfällt. Die Kurve zeigt einen auffällig unruhigen Verlauf. Die Verläufe der 30- und 40-min-Werte waren nur bis zum 6. Tage verfolgbar, da dann die Aktivitäten in der Fehlerbreite der Messungen untertauchten.
2. Bei der logarithmischen Darstellung fällt beim Nativwert der gleichmäßige Verlauf und die weitgehende Übereinstimmung der drei Einzelwerte auf. Der Verlauf ist fast linear. Bei den 10-min-Werten ist der Verlauf deutlich steiler, auch im linearen Teil. Für die Denaturierungsstufe 30 min ist der Verlauf der Funktion weniger gleichmäßig, die Werte gehen noch mehr als bei der vorhergehenden Funktion auseinander. Der initiale Abfall ist bedeutend, wie schon aus 1. zu sehen war. Bei dem Wert von 40 min fallen wieder die starken Schwankungen auf, die bei Rückgang auf den Wert Null eine logarithmische Dar-

stellung nicht ermöglichten, so daß diese Werte in diesen Funktionen nicht berücksichtigt werden konnten. (Abb. 24 - 27).

3. Auch diesmal wurden die Halbwertzeiten in der oben geschilderten Weise ermittelt, wobei noch zu sagen ist, daß bei den Werten mit 30 und 40 min die doppelte Zahl an Einzelsteigungen aufgesucht wurde, um die Fehlerbreite (durch den unregelmäßigen Verlauf bedingt) zu mindern.

Nativwert	Kaninchen 1	:	144 Stunden
	" 2	:	165 "
	" 3	:	165 "

Der Mittelwert betrug 158 Stunden.

10 min denaturiert:	Kaninchen 4	:	90 Stunden
	" 5	:	101 "
	" 6	:	63 "

Der Mittelwert betrug 85 Stunden.

30 min denaturiert:	Kaninchen 7	:	32 Stunden
	" 8	:	11 "
	" 9	:	32 "

Der Mittelwert betrug 25 Stunden.

40 min denaturiert:	Kaninchen 10	:	nicht zu er- mitteln, da zu wenig Werte
	" 11	:	17 Stunden
	" 12	:	14 "

Der Mittelwert betrug 16 Stunden.

4. Die Halbwertzeit-Denaturierungszeit-Funktion (Abb. 28). Wir sehen aus dieser Funktion, daß sowohl die mittlere Halbwertzeit, als auch die aller Einzelwerte mit zunehmender Denaturierungszeit sinkt. Der Abfall ist so groß, daß der Wert von 40 min eine um 140 Stunden niedrigere Halbwertzeit hat als der Nativwert. Damit entspricht der Verlauf der Funktion (Abb. 19) bei 65° Dena-

turierungstemperatur, bei welcher ja auch die Halbwertszeit absinkt.

e) Zusammenfassung der Ergebnisse der in vivo-Versuche

Die Halbwertszeit des Albumins steigt nach kurzer Hitzedenaturierung an und fällt dann bei weiterer Denaturierung weit unter die Normwerte ab (Abb. 19 u. 28). Das Albumin verhält sich im untersuchten Bereich genau umgekehrt wie das Gamma-Globulin, bei welchem die Halbwertszeit der untersuchten Denaturierungsstufen mit zunehmender Denaturierungszeit ansteigt. (Abb. 10). Wenn man die Denaturierungstemperatur von vornherein höher bemisst (75°), so kommt ein Anstieg der Halbwertszeiten für Albumin in der Anfangsphase nicht mehr zur Beobachtung (Abb. 28).

B. Ergebnisse der in vitro-Versuche

Die ermittelten Werte wurden nach folgender Methode ausgewertet:

Die an die Erythrozyten oder die Aktivkohle adsorbierte Aktivität wurde in Prozent der angebotenen Aktivität ausgedrückt. Die ermittelten Prozente wurden auf der Ordinate abgetragen. Auf der Abszisse trugen wir die Denaturierungszeit in Minuten auf. Es wurden alle Einzelwerte in die Funktionen eingezeichnet, ferner die Mittelwerte.

a) Die Ergebnisse der Gamma-Globulin-Beladungsversuche

1. Die Adsorption an Erythrozyten

I. Denaturierungstemperatur 60°C (Abb. 29)

Beim nicht denaturierten Protein liegt die mittlere Adsorption bei 0,203 %. Nach 1 min Denaturierung steigt der Mittelwert auf 0,227 % an, alle Einzelwerte machen den Anstieg mit. Bei 3 min Erhitzung fällt die Adsorption wieder zum Normalwert ab, steigt nach 5 min wieder auf 0,214 % im Mittel. Nach 10 min beträgt sie 0,221 %, dann fällt sie weiter nach 20 min ab auf 0,200 %, d. h. unter den Nativwert. Am deutlichsten ausgeprägt ist der Anstieg der Adsorption nach 1 min und der Abfall nach 3 min. Dann beginnen die Werte stärker zu streuen.

II. Denaturierungstemperatur 65°C (Abb. 30)

Der Verlauf der Kurve erinnert stark an I., jedoch ist die Funktion in Richtung der Abszisse gedehnt, und nimmt auch in den Ordinatewerten einen größeren Raum ein. Der Nativwert liegt bei 0,211 im Mittel. Bei 1 min erfolgt ein Anstieg, der jedoch bis zu dem 5 min-Wert anhält und eine Höhe von 0,243 % im Mittel erreicht. Dann beginnt der bei I. schon nach 1 min beobachtete Abfall, der bei 10 min 0,201 % erreicht. Dann steigt die Funktion wieder an, die Ordinate des 20 min-Wertes beträgt 0,237 %. Dies würde bei I. dem 5 min-Wert entsprechen. Wie sehen, daß die Funktion in der Abszisse

gegenüber I. um das 4-fache gedehnt ist.

III. Denaturierungstemperatur 70° C (Abb. 31)

Der Verlauf der Funktion ist den beiden vorhergegangenen kaum noch ähnlich. Lediglich der initiale Anstieg zum 1 min-Wert ist noch zu erkennen. Nach diesem kommt dann ein sehr geringer Abfall, woraufhin die Kurve bis zum 20 min-Wert hin ansteigt. Es fällt auf, daß die Werte stärker streuen als bei I. und II..

2. Die Adsorption an Aktivkohle

I. Denaturierungstemperatur 60° C (Abb. 32)

Vom Ausgangswert 81,4 % fällt die Adsorption bis zu 78,4 % beim 3 min-Wert. Sie steigt dann bei 5 min wieder auf 81,5 % und endet bei 80 %. Es lassen sich keine Analogien zu der Erythrozytenbeladung feststellen.

II. Denaturierungstemperatur 65° C (Abb. 33)

Der Kurvenverlauf entspricht dem bei Denaturierungstemperatur 60° C. Es gilt das für I. gesagte.

III. Denaturierungstemperatur 70° C (Abb. 34)

Bei dieser Funktion sind deutliche Schwankungen festzustellen, was ja bei I. und II. nicht der Fall war. Die Adsorption steigt zunächst an, fällt dann wieder auf den Nativwert ab, steigt erneut an bis zum 5 min-Wert, um dann endgültig zu fallen. Der Verlauf dieser Funktion hat eine gewisse Ähnlichkeit mit der Erythrozytenadsorption bei 60° C, die ja auch erst steigt, und beim Endwert unter dem Ausgangswert liegt. Die Funktion III. ist jedoch im Bezug auf die vorgenannte Kurve in der Ordinate stark gedehnt. Eine Ähnlichkeit von III. mit der entsprechenden Erythrozytenfunktion ist nicht zu finden.

b) Die Ergebnisse der Albumin-Beladungsversuche

1. Die Adsorption an Erythrozyten

I. Denaturierungstemperatur 70°C (Abb. 35)

Der Nativwert zeigt eine Adsorption von 0,174 % im Mittel. Die Adsorption steigt bei 1 min auf 0,197 %, bei 3 min auf 0,217 %, bleibt bis 5 min konstant, steigt nach 10 min auf 0,242 % und nach 20 min auf 0,250 % an. Die Funktion zeigt also einen wellenförmigen Anstieg.

II. Denaturierungstemperatur 75°C (Abb. 36)

Der Verlauf der Funktion ist dem Verlauf bei Gamma-Globulin der Stufe 60°C sehr ähnlich. Auf den initialen Anstieg bis 1 min folgt ein Abfall bis 3 min, dann leichter Anstieg bis 20 min.

III. Denaturierungstemperatur 80°C (Abb. 37)

Die hier gefundene Funktion gleicht sehr der Funktion I. Auch hier steigen die Adsorptionswerte im gesamten Verlauf an, und haben zwischen 1 und 5 min einen mehr horizontalen Verlauf. Der Anstieg vom Nativwert mit 0,123 % im Mittel bis zum 1 min-Wert 0,163 % ist beträchtlich. Der 5 min-Prozentsatz beträgt 0,172 %. Von hier ab verläuft die Kurve sehr steil bis zum 10 min-Wert mit 0,220 % und 20 min-Wert mit 0,237 %.

Der bei dieser Denaturierungstemperatur beobachtete Anstieg der Adsorption mit Zunahme der Denaturierungszeit ist der stärkste, der bei Erythrozytenbeladungen beobachtet wurde.

2. Die Adsorption an Aktivkohle

I. Denaturierungstemperatur 70°C (Abb. 38)

Im Gegensatz zu der Erythrozytenbeladung fällt hier die Adsorption und erreicht beim 20 min-Wert ein Minimum. Der Abfall vollzieht sich wellenförmig.

II. Denaturierungstemperatur 75°C (Abb. 39)

Die Streubreite der Werte ist größer als bei I..

Insgesamt scheint auch hier ein Abfall der Adsorptionswerte einzutreten.

III. Denaturierungstemperatur 80° C (Abb. 40)

Wie bei den vorhergegangenen Aktivkohle-adsorptionen liegt auch hier der Nativadsorptionswert bei 85 %. Er sinkt nach 1 min auf 76 %, nach 3 min auf 69,4 %, nach 20 min auf 67,3 %. Der Abfall der Adsorption ist hier also extrem stark ausgeprägt. Dies steht im Gegensatz zu dem bei der analogen Erythrozytenbehandlung ermittelten Adsorptionsverhalten, wo ja gerade bei dieser Denaturierungsstufe die maximalen Adsorptionsanstiege zu verzeichnen waren.

c) Zusammenfassung der Ergebnisse der in vitro-Versuche

Bei den Beladungen von Erythrozyten mit Gamma-Globulin ließ sich eine wellenförmig verlaufende Adsorption in Abhängigkeit von Temperatur und Denaturierungszeit demonstrieren. Die analogen Untersuchungen mit Albumin zeigten insgesamt gesehen einen Anstieg der Adsorption mit zunehmender Denaturierungszeit und -temperatur. Die vergleichenden Adsorptionen an Aktivkohle ließen beim Gamma-Globulin erkennen, daß bei stärkerer Denaturierungstemperatur und steigender -zeit die Adsorption gering abnahm. Jedoch ist die Adsorptionsveränderung hier insgesamt nur minimal.

Im Gegensatz hierzu zeigt die Adsorption des Albumins an die Aktivkohle, daß mit zunehmender Denaturierungszeit und -temperatur eine Abnahme der angelagerten Substanzmenge eintritt.

Die vergleichende Betrachtung zwischen der Adsorption an Erythrozyten einerseits und Aktivkohle andererseits zeigt beim Gamma-Globulin keinerlei Beziehung.

Beim Albumin ist ein entgegengesetztes Verhalten zu beobachten, die Adsorption an Erythrozyten steigt mit zunehmender Denaturierung, während sie bei Aktivkohle abfällt.

Jet - Misch - Apparat

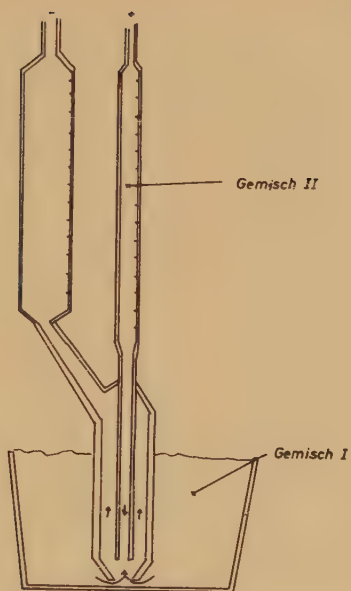
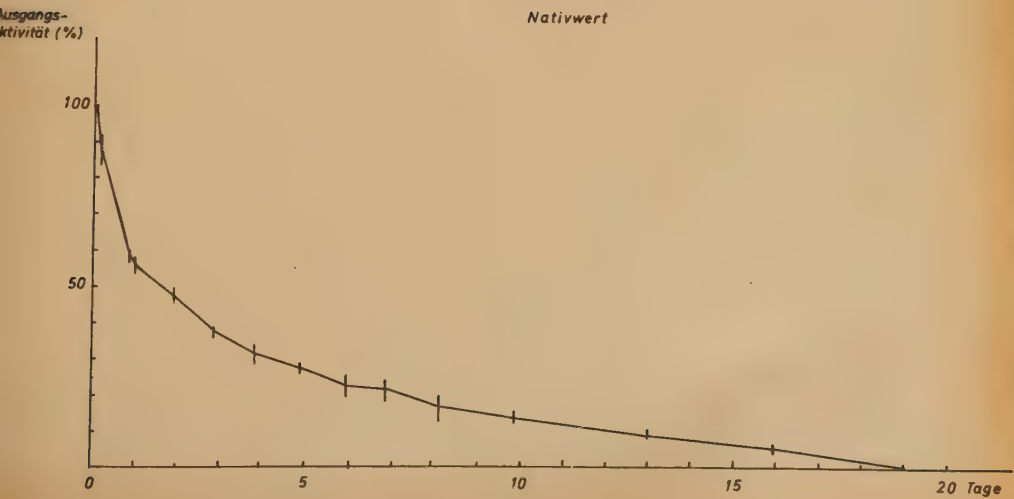


Abb.1

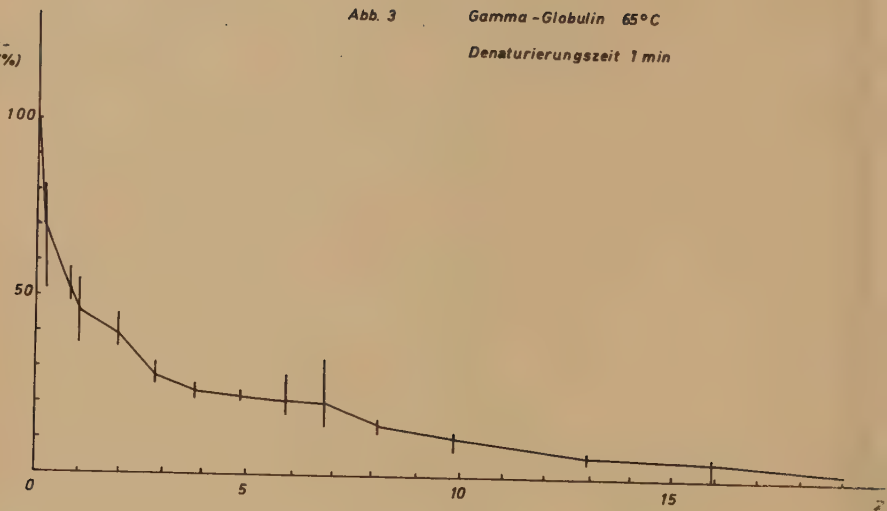
Abb.2

Gamma - Globulin 65°C

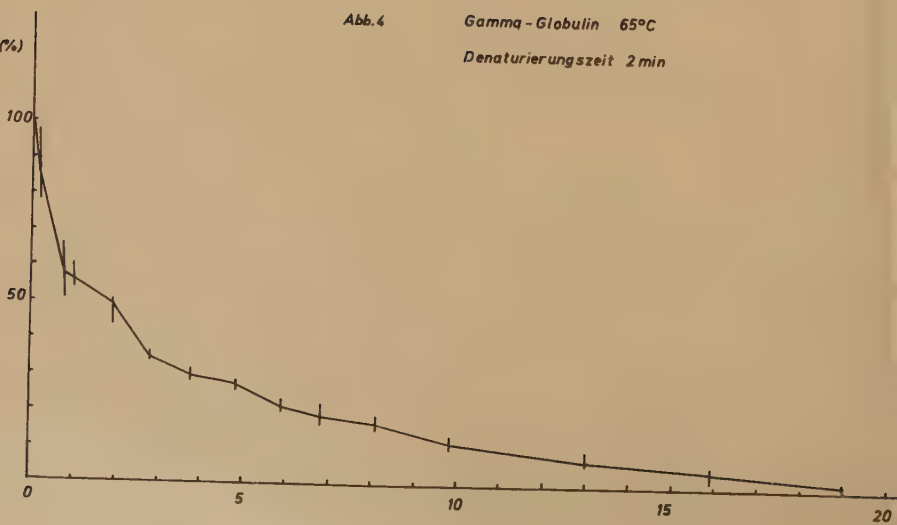
Nativwert

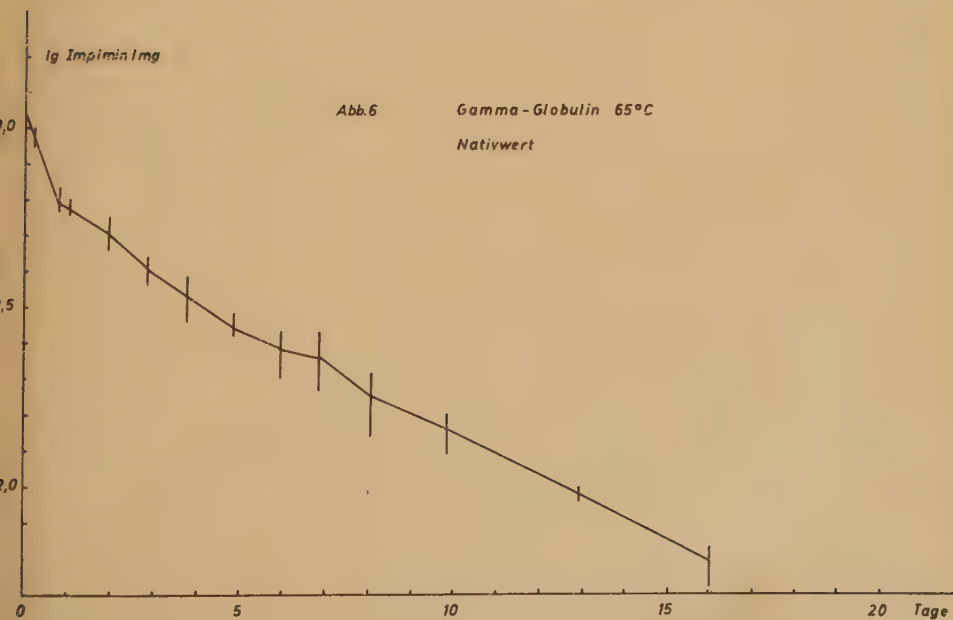
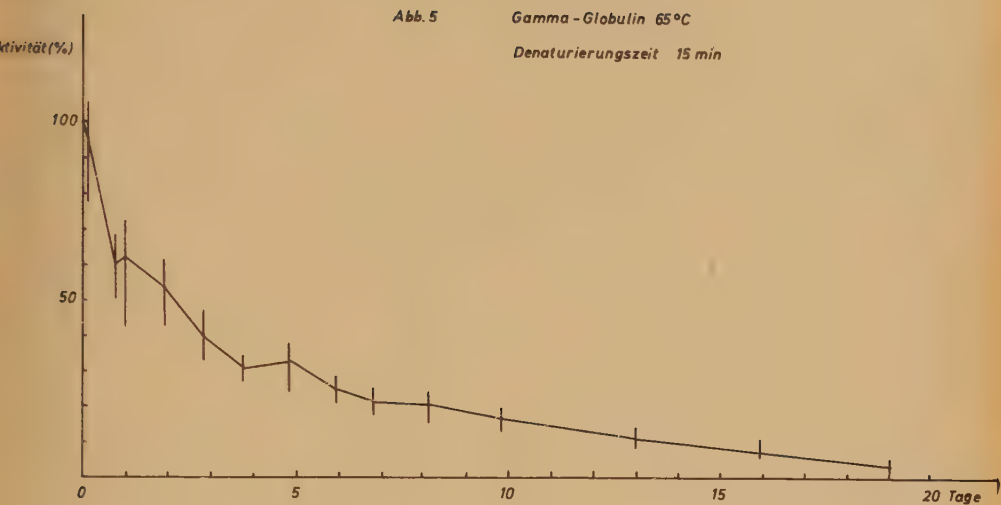


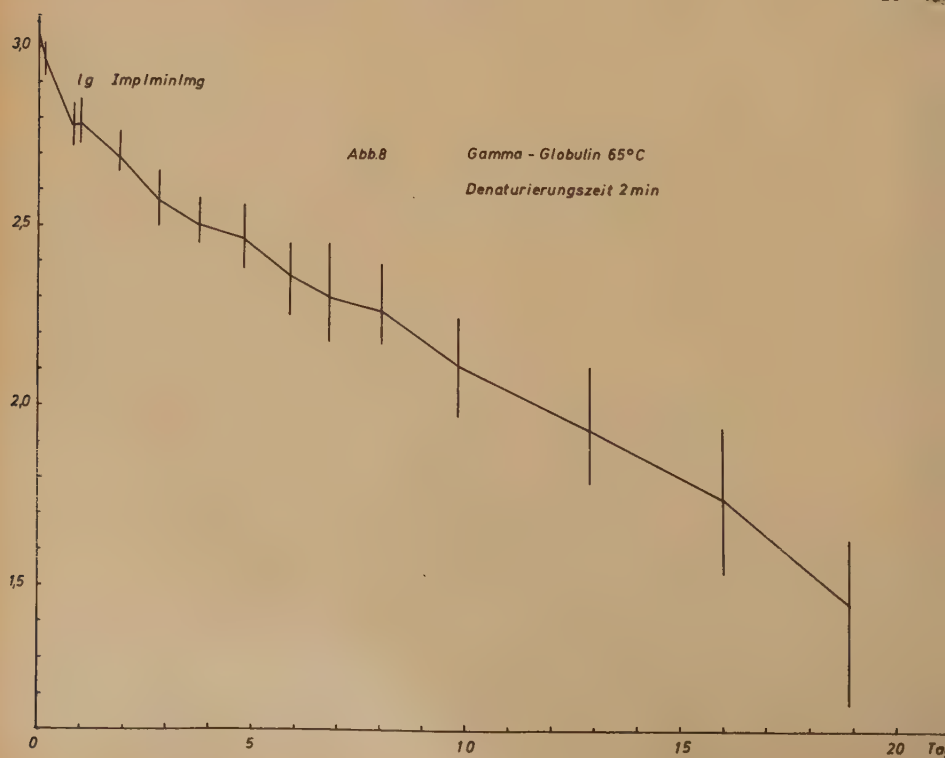
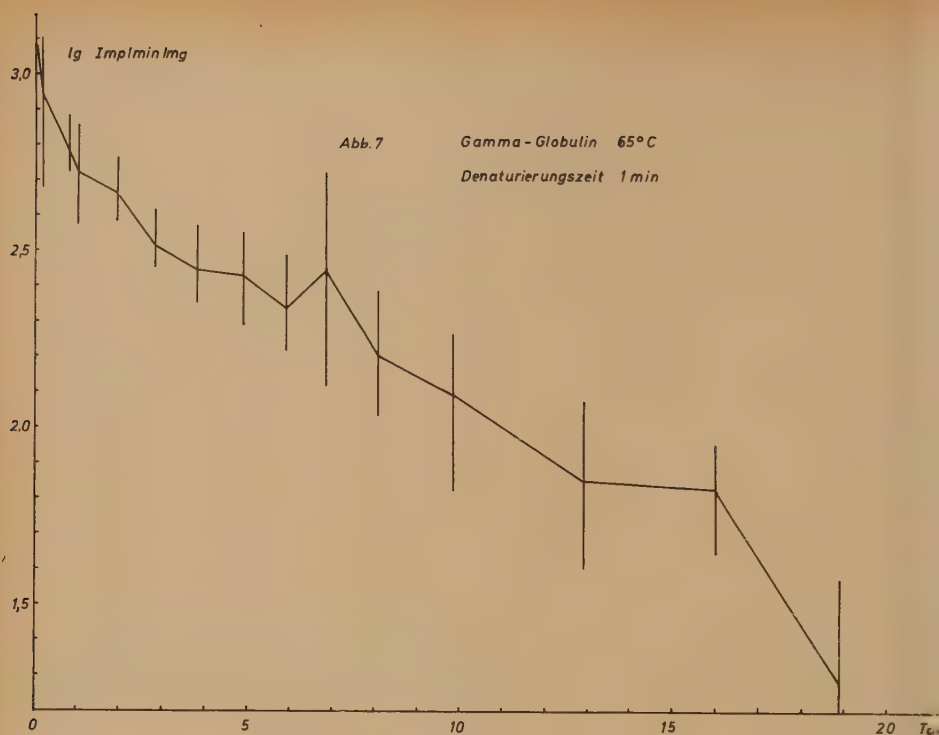
Ausgangs-
aktivität (%)



Aktivität (%)







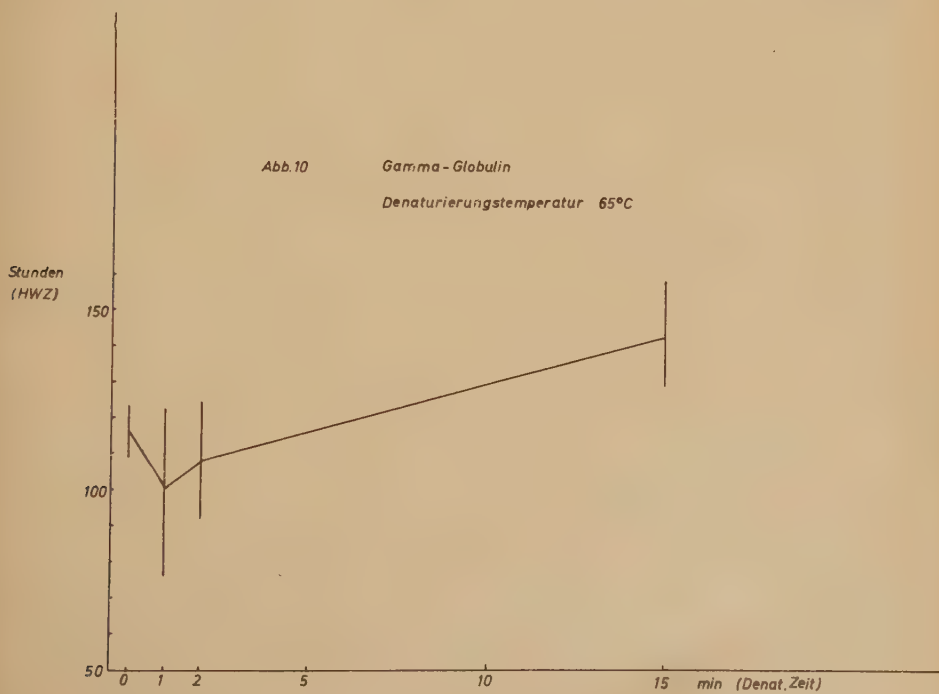
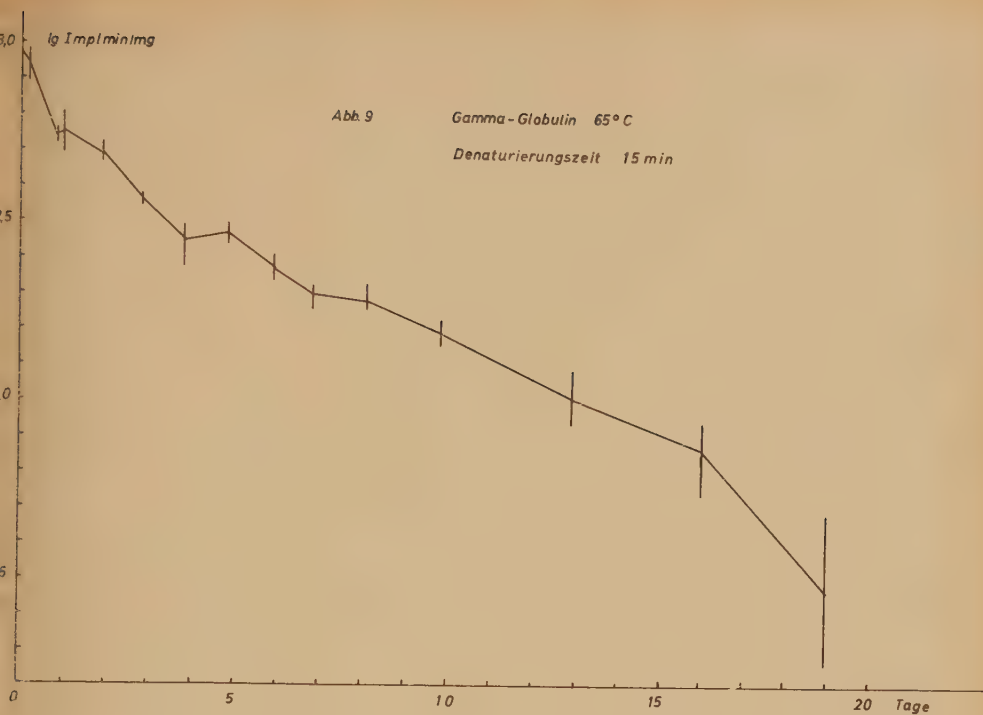


Abb. 11

Albumin 65°C

Nativwert

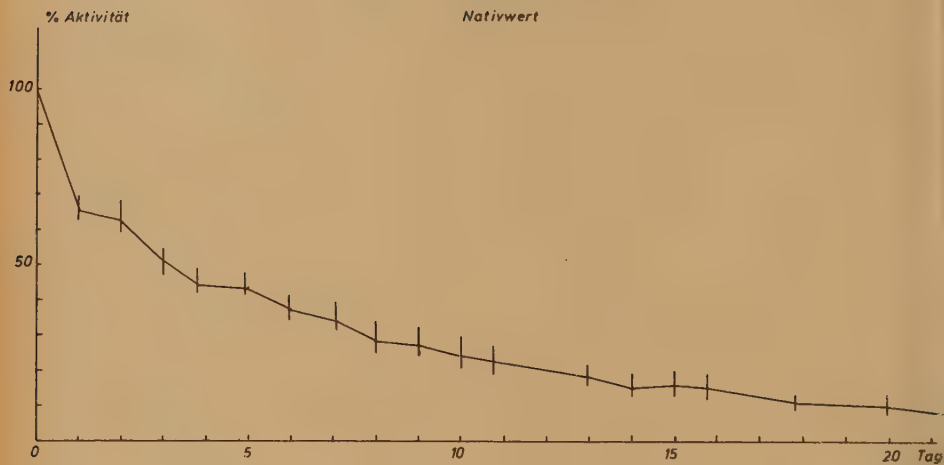


Abb. 12

Albumin 65°C

Denaturierungszeit 1 min

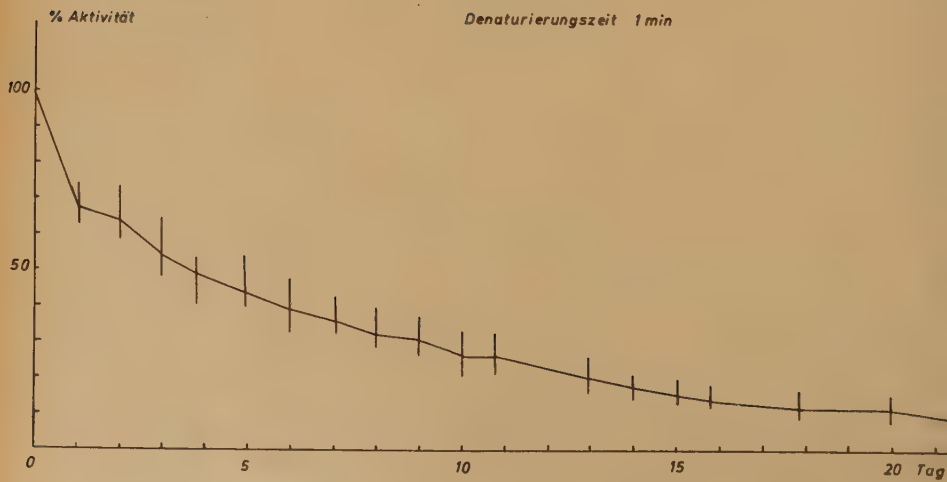


Abb.13

Albumin 65°C

Denaturierungszeit 2 min

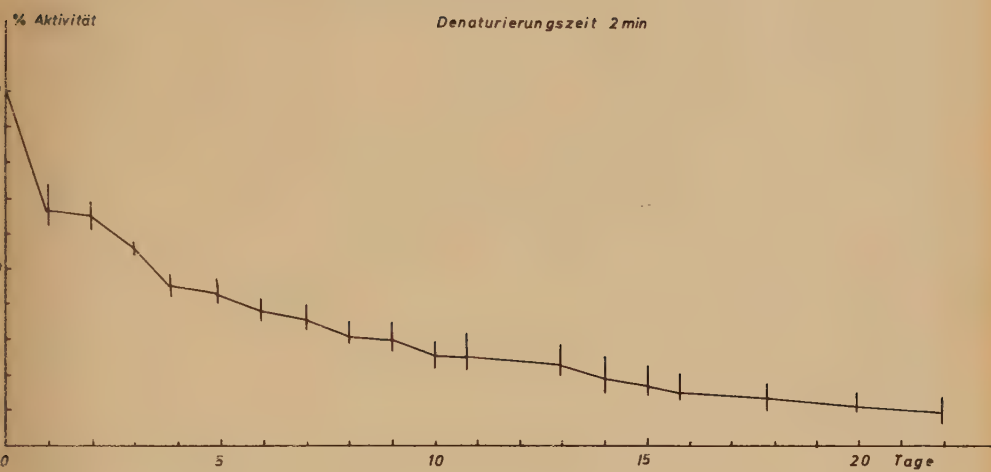
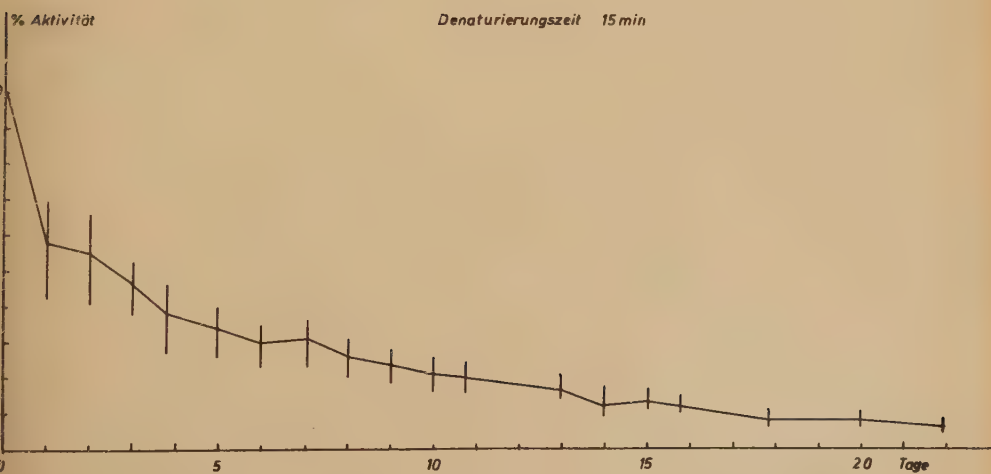
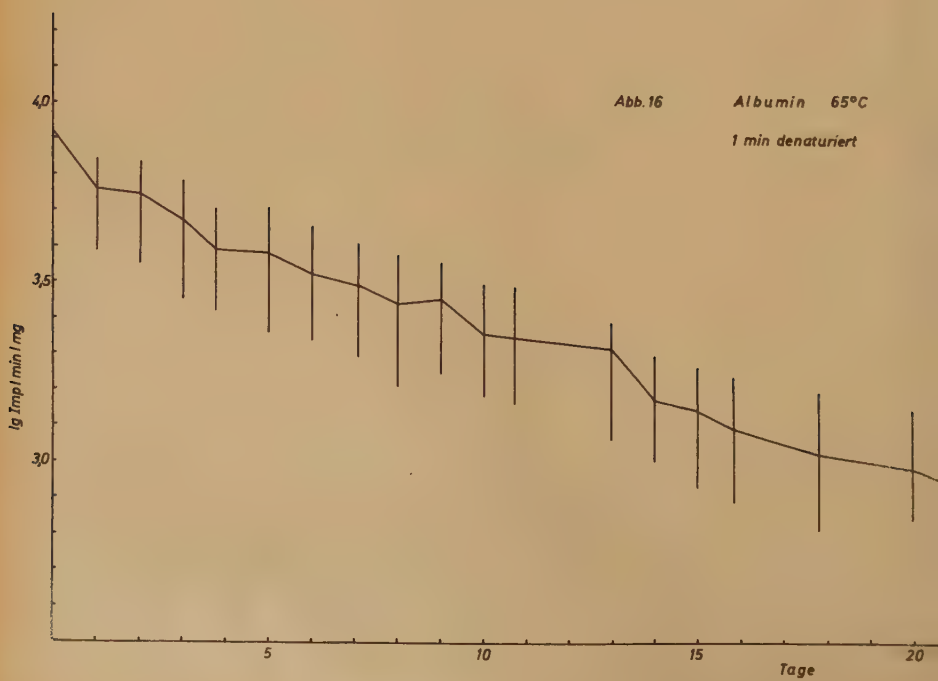
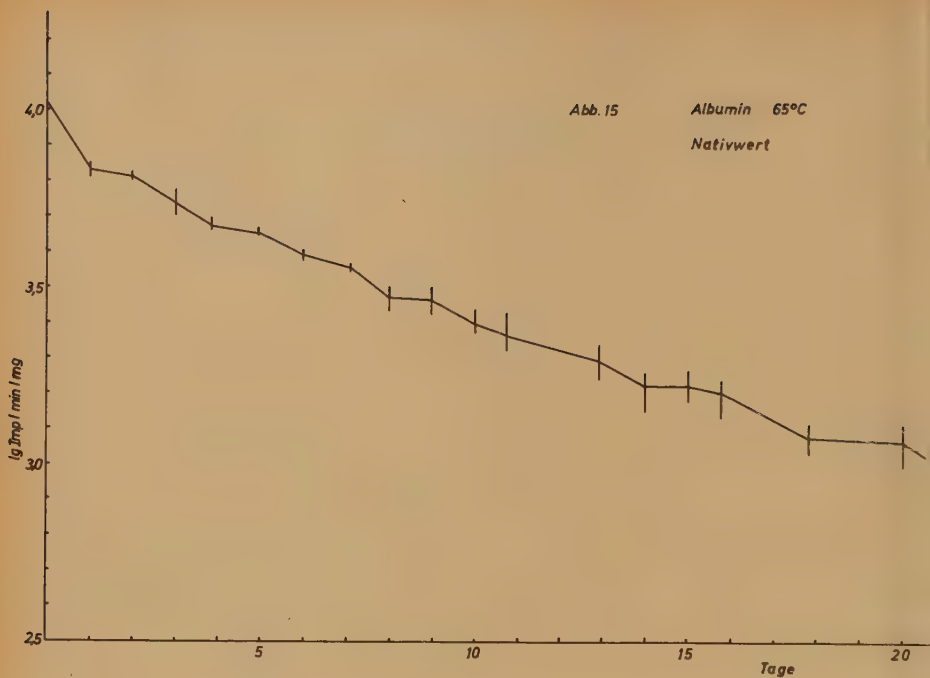


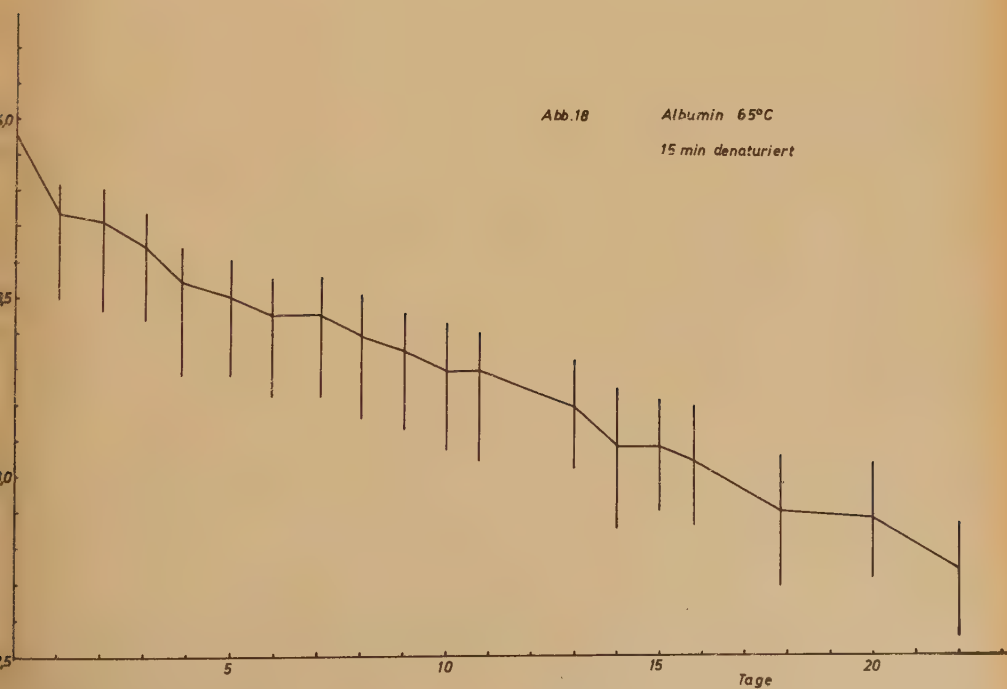
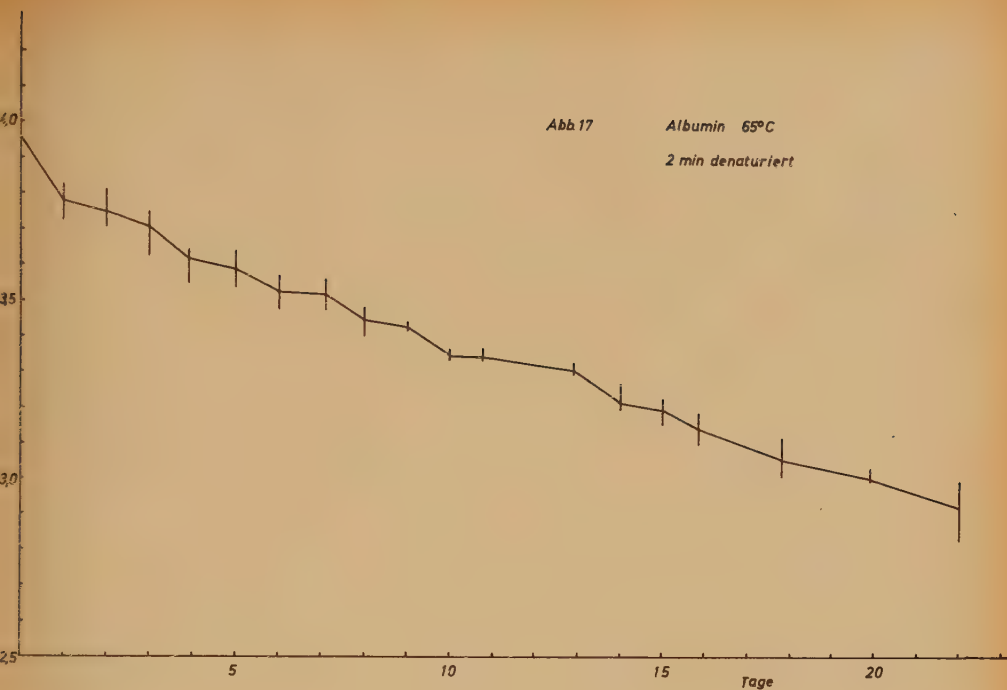
Abb.14

Albumin 65°C

Denaturierungszeit 15 min







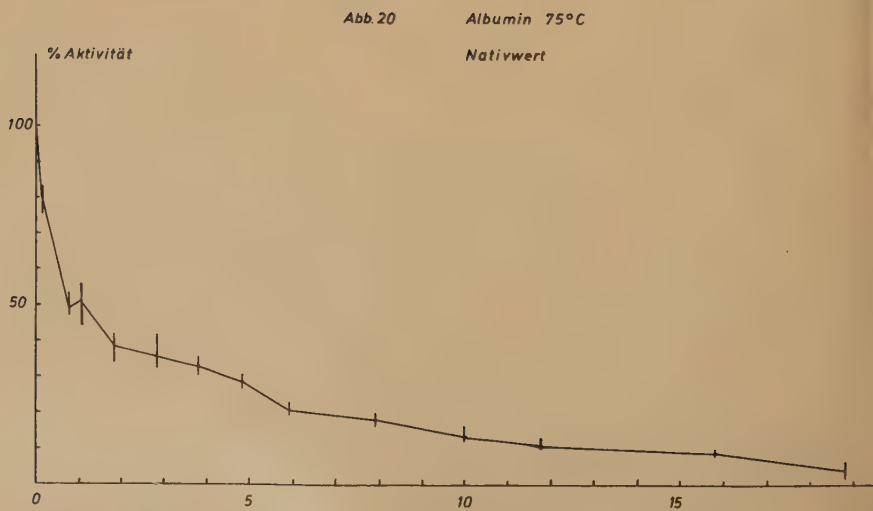
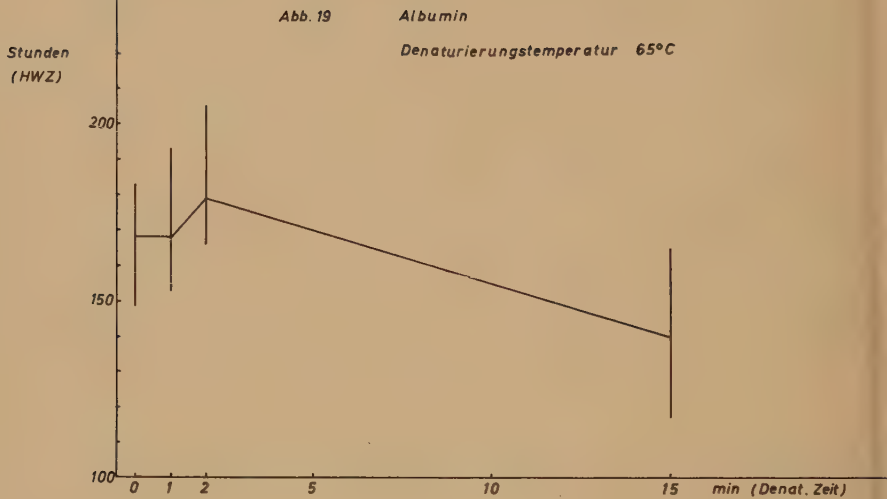


Abb. 21

Albumin 75°C

Denaturierungszeit 10 min

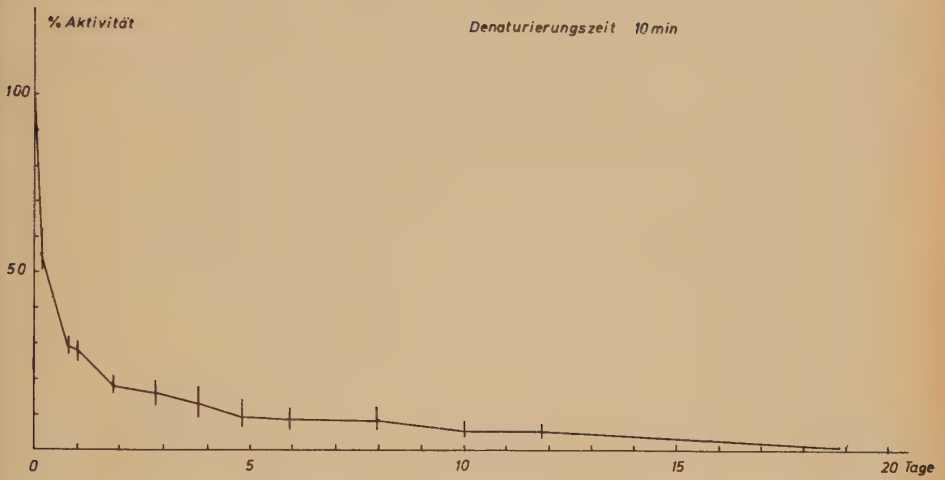


Abb. 22

Albumin 75°C

Denaturierungszeit 30 min

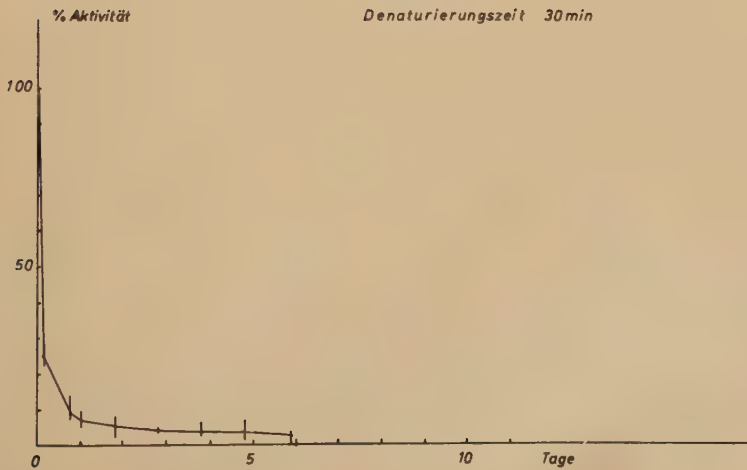


Abb. 23

Albumin 75°C

Denaturierungszeit 40 min

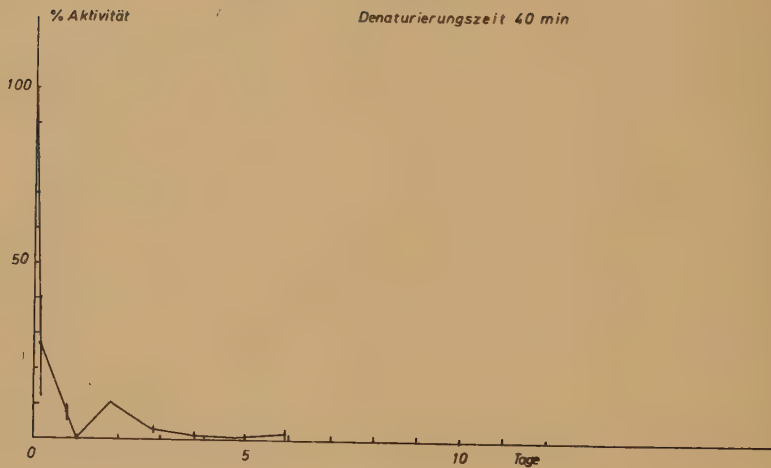


Abb. 24

Albumin 75°C

Nativwert

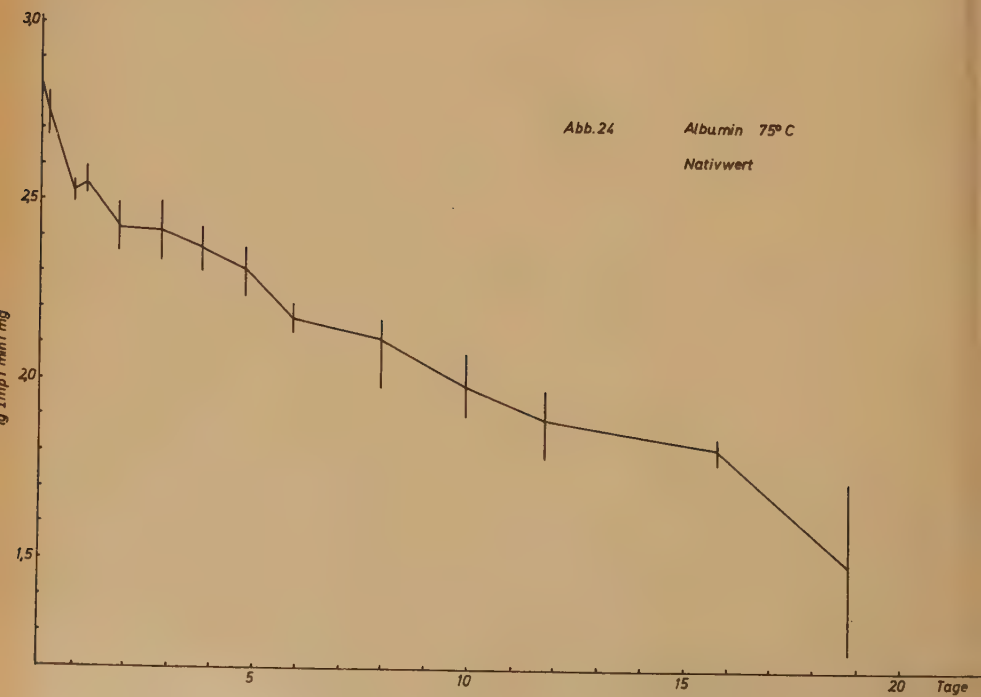


Abb. 25

Albumin 75°C

Denaturierungszeit 10 min

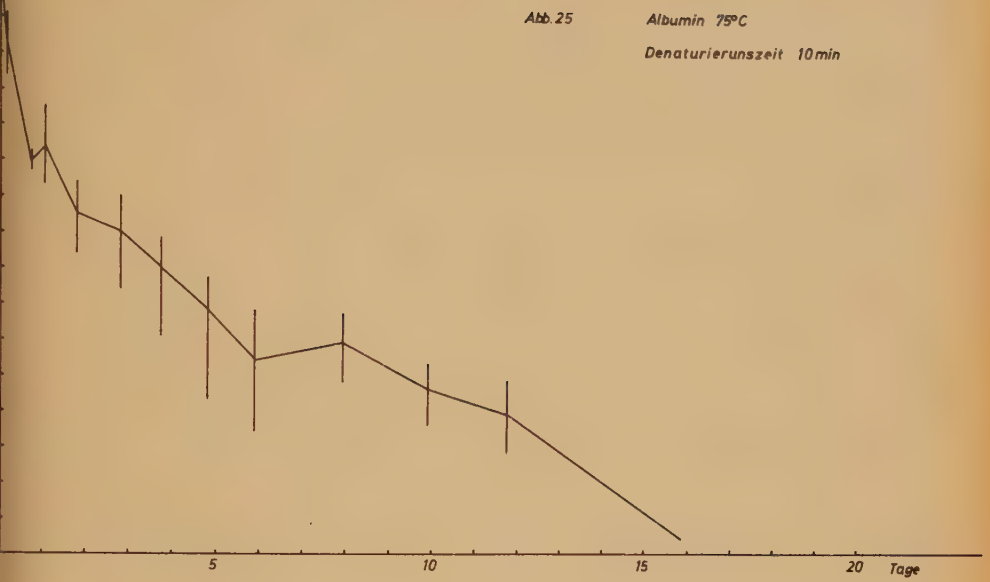
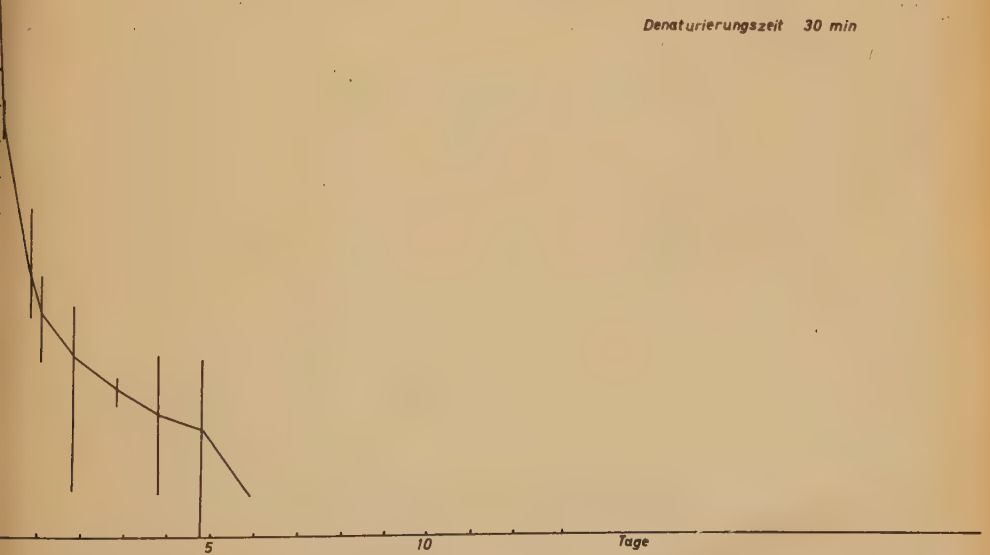


Abb. 26

Albumin 75°C

Denaturierungszeit 30 min



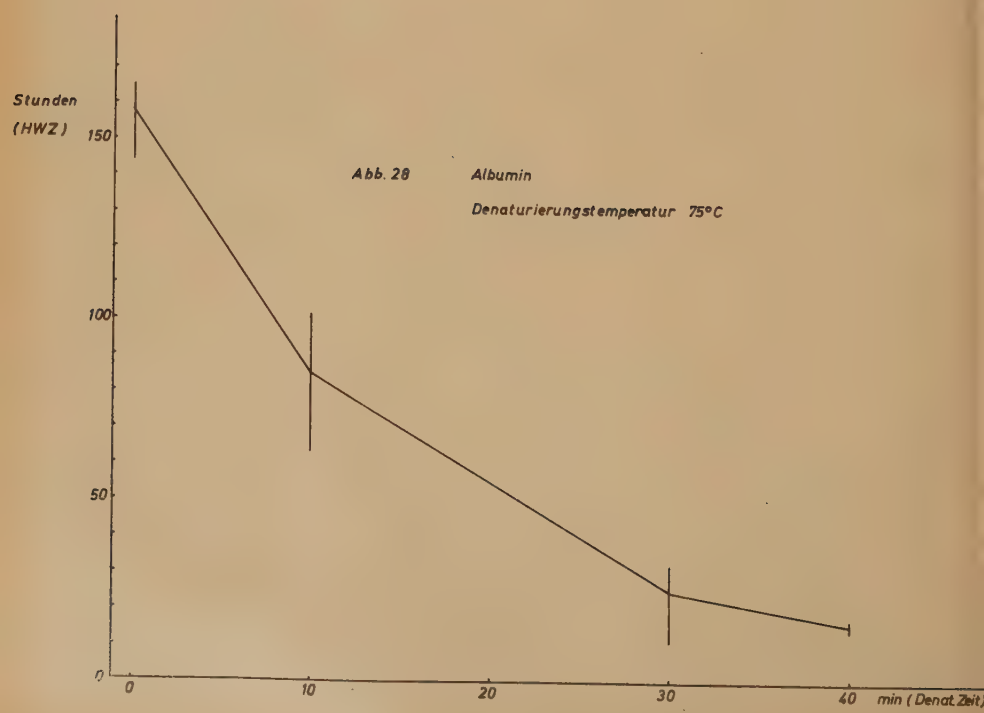
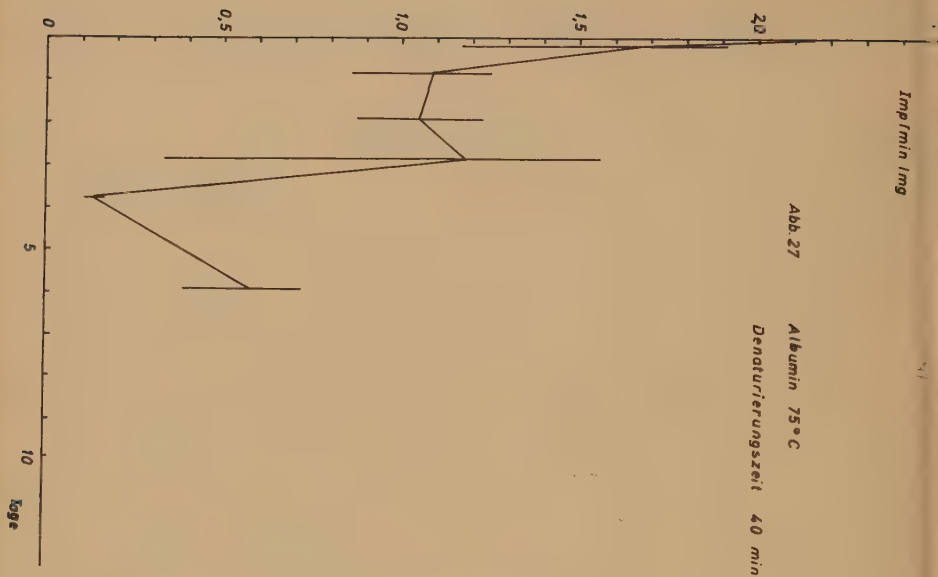


Abb. 29

Beladung von Erythrozyten mit Gamma-Globulin (60 °C)

Adsorption (%)

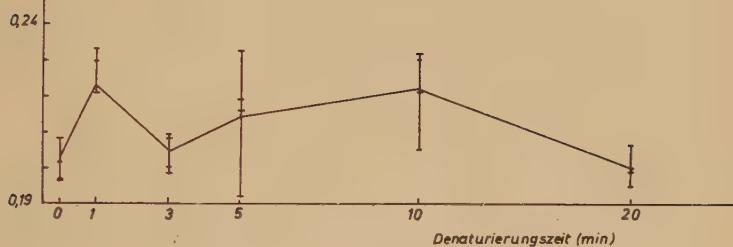


Abb. 30

Beladung von Erythrozyten mit Gamma-Globulin (65 °C)

Adsorption (%)

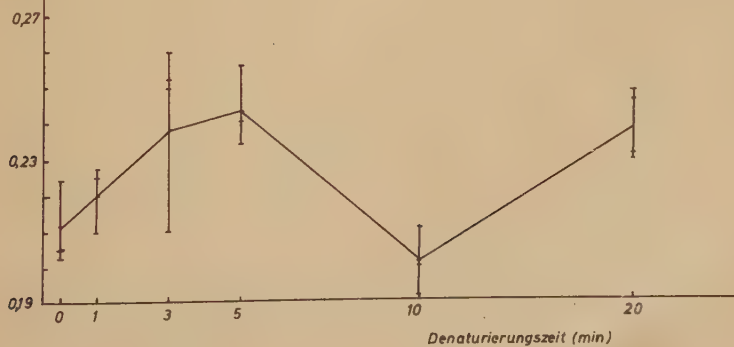


Abb. 31

Beladung von Erythrozyten mit Gamma - Globulin (70° C)

Adsorption (%)

0,27

0,23

0,19

Denaturierungszeit (min)

0

1

3

5

10

20

Abb. 32

Beladung von Aktivkohle mit Gamma-Globulin (60° C)

Adsorption (%)

83

80

77

Denaturierungszeit (min)

0

1

3

5

10

20

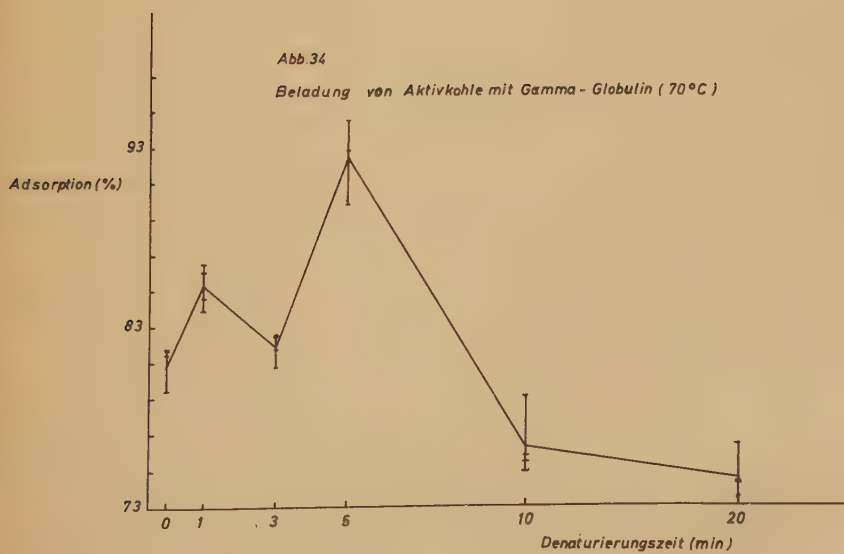
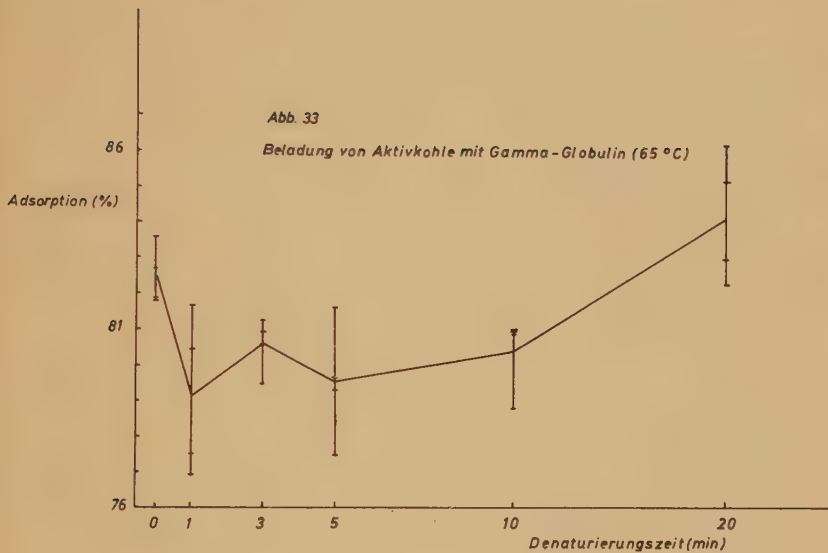


Abb. 35

Beladung von Erythrozyten mit Albumin (70°C)

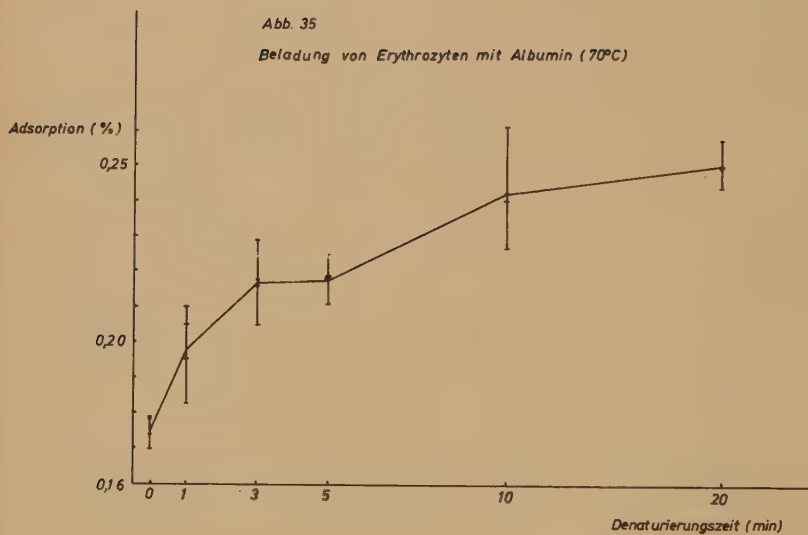


Abb. 36

Beladung von Erythrozyten mit Albumin (75°C)

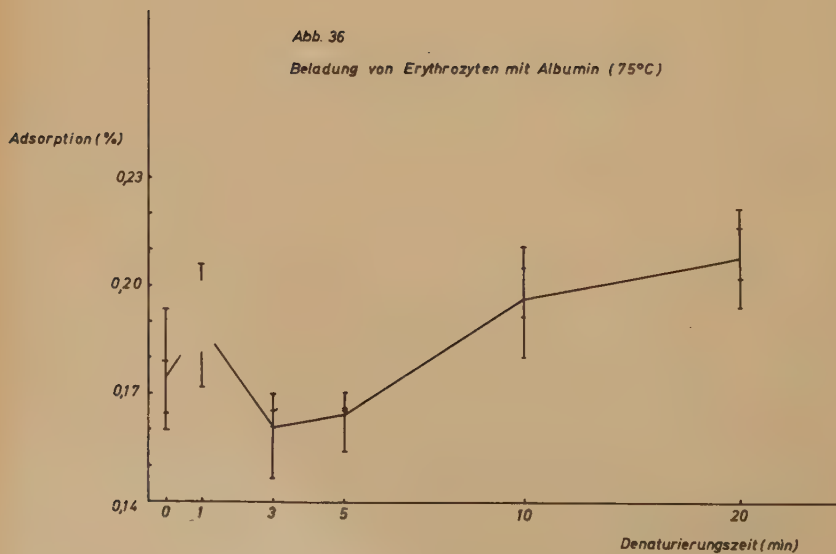


Abb. 37

Beladung von Erythrozyten mit Albumin (80°C)

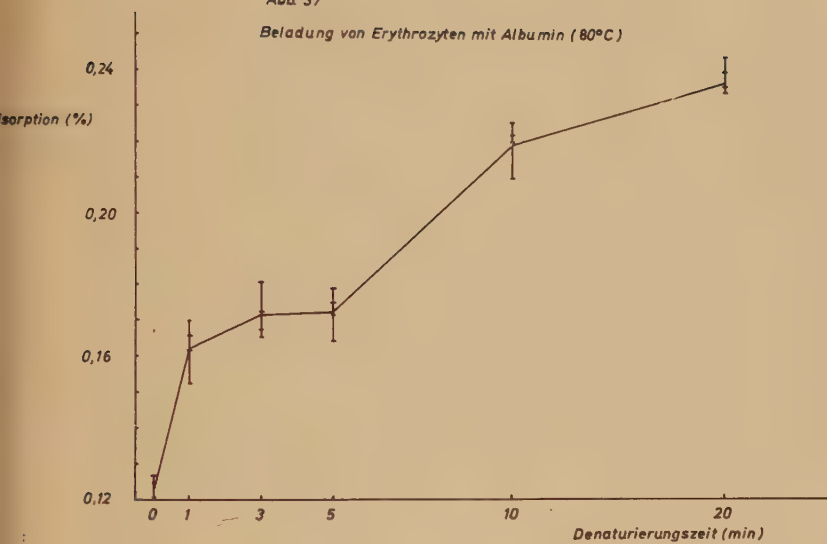


Abb. 38

Beladung von Aktivkohle mit Albumin (70°C)

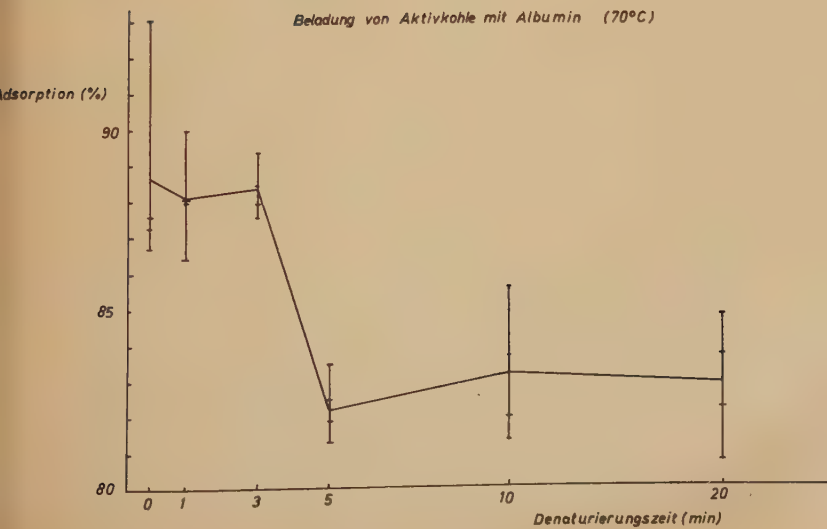


Abb.39

Beladung von Aktivkohle mit Albumin (75°C)

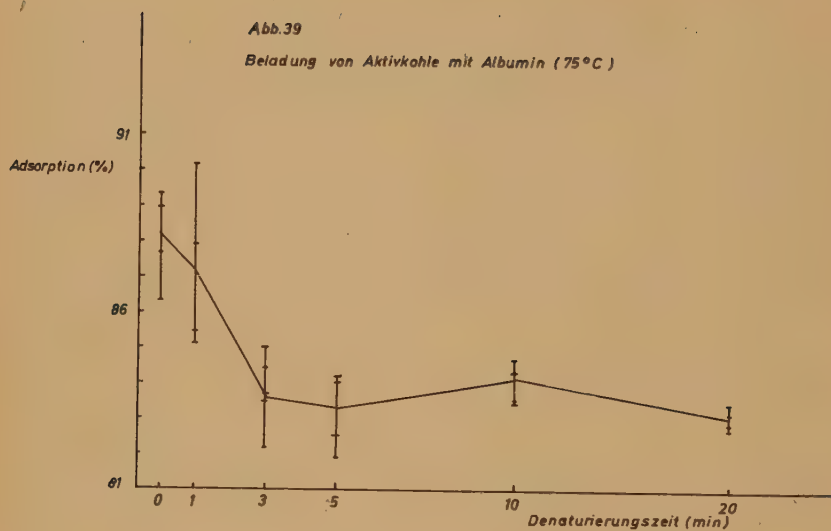
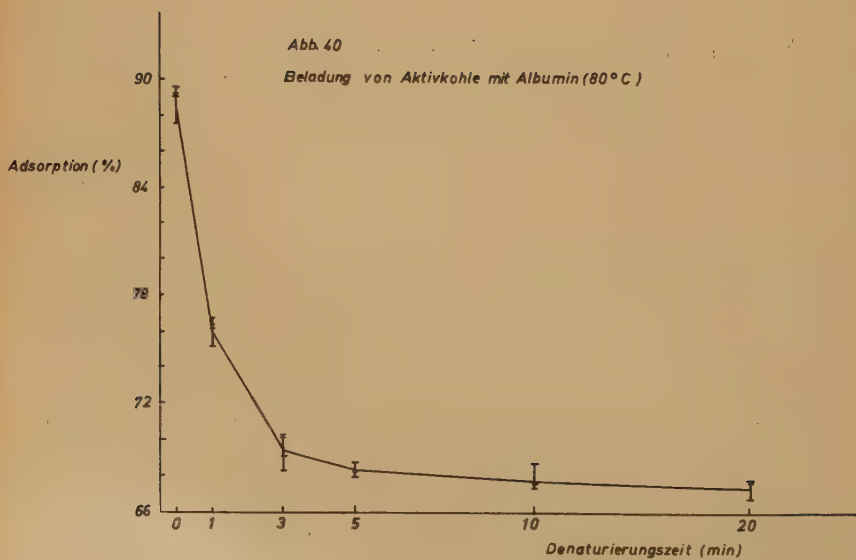


Abb. 40

Beladung von Aktivkohle mit Albumin (80°C)



Diskussion

1. Wir hatten bei unseren Untersuchungen die Absicht, das biologische Verhalten von nativem und stufenweise Hitze-denaturiertem Albumin und Gamma-Globulin im Tierversuch am Kaninchen zu verfolgen. Soweit möglich sollten Parallelen und Analogien zum in vitro Adsorptionsverhalten derselben Stoffe gefunden werden. Dabei gingen wir von der Vorstellung aus, daß im Zusammenhang mit dem physiologischen Abbau von Albumin und Gamma-Globulin im Organismus eine Alterung im physiko-chemischen Bereich der Moleküle erfolgt, welche wir in analoger Weise durch die Hitzedenaturierung zu imitieren versuchten. Es sollte das biologische Verhalten der Plasmaeiweißkörper in Abhängigkeit vom Hitzedenaturierungsgrad mit dem in vitro Adsorptionsverhalten gleicher Weise denaturierter Substanz verglichen werden.
2. Als Vorbemerkung ist darauf hinzuweisen, daß eine Diskrepanz besteht zwischen der von uns gefundenen Halbwertszeit der nativen ^{131}Jod -Proteine und der allgemein in der Literatur für human-Proteine angegebenen Halbwertszeit, die bei Untersuchungen mit ^{131}Jod -Protein zwischen 9,5 bis 11,5 Tagen für das Albumin sowie 11,5 bis 19 Tage für das Gamma-Globulin angegeben werden (2, 8,). Bei unseren Untersuchungen betrug die Halbwertszeit im Mittel für das Albumin 6,5 bis 7 Tage und für das Gamma-Globulin 4,8 Tage. Wir möchten diesen Unterschied methodisch erklären und glauben, daß die intensive ^{131}Jod -Beladung unserer Präparate als Ursache einer Vor-Denaturierung anzusehen ist, wobei das empfindliche Gamma-Globulin-Molekül mehr als das robustere Albumin-Molekül betroffen ist wie auch schon von McFarlane beschrieben wurde (5). Da in unserer Versuchsanordnung der zusätzliche Denaturierungseffekt durch thermische Einwirkung im Vergleich zum nicht-thermisch alterierten Protein untersucht werden sollte, möchten wir meinen, daß die Vor-Denaturierung durch die Präparation der ^{131}Jod -Proteine keine Bedeutung im Sinne eines grundsätzlichen Fehlers hat.

3. In der nachfolgenden Tabelle werden die Grund-Trends der biologischen Verhaltensweisen und Adsorptionen durch symbolische Pfeile dargestellt.

(↑ Zunahme, ↓ Abnahme, ↔ keine Änderung)

	<u>Albumin</u>	<u>Gamma-Globulin</u>
Halbwertzeit 1 min Denat. 65°C	↕	↓
" 2 " " "	↕	↑
" 15 " " "	↓	↑
Halbwertzeit bei 75° C	↓	nicht meßbar
Adsorption an Erythrozyten		↕
Adsorption an Aktivkohle (T = 60° C ; t = 0 - 20 min)		↕
Adsorption an Erythrozyten		↕
Adsorption an Aktivkohle (T = 65° C ; t = 0 - 20 min)		↕
Adsorption an Erythrozyten	↑	↑
Adsorption an Aktivkohle (T = 70° C ; t = 0 - 20 min)	↓	↓
Adsorption an Erythrozyten	↑	
Adsorption an Aktivkohle (T = 75° C ; t = 0 - 20 min)	↓	
Adsorption an Erythrozyten	↑	
Adsorption an Aktivkohle (T = 80° C ; t = 0 - 20 min)	↓	

Bei der Betrachtung der Adsorptions- und Halbwertzeitkurven, die zu der obigen Tabelle führten, fällt auf, daß die Adsorption von Albumin an Erythrozyten und Aktivkohle zu eindeutigen Zu- und Abnahmen geführt hat. Beim Gamma-Globulin ist dies nicht der Fall. Als Ursache für die geringere Aussagekraft der Gamma-Globulin-Be-
ladungen ist wohl der komplexere Aufbau dieser Fraktion im Gegensatz zur einfacheren Struktur des Albumins verantwortlich zu machen, was zu einem "Schmiereffekt" beim

Gamma-Globulin geführt haben mag. Wir möchten also postulieren, daß die Denaturierung im molekularen Bereich beim Albumin einheitlicher erfolgt als beim Gamma-Globulin.

Betrachtet man unter den oben gemachten Einschränkungen die aus den Ergebnissen folgende Korrelation zwischen Adsorption und Halbwertszeit in der Tabelle, so sieht man, daß beim Gamma-Globulin die Adsorption im untersuchten Bereich bis 70° C fast ausschließlich gleich bleibt, die Halbwertszeit des bei 65° C denaturierten Gamma-Globulin jedoch länger wird. Beim Albumin verhält sich in allen Fällen die Adsorption an Erythrozyten und Aktivkohle entgegengesetzt, die Adsorption an Erythrozyten steigt jedesmal mit zunehmender Denaturierung, die an Aktivkohle fällt. Die Halbwertszeit des Albumins zeigt die Tendenz mit zunehmender Denaturierungszeit kürzer zu werden.

4. Zur Beantwortung der Frage, warum die Verhaltensweise der Plasmaeiweißkörper Albumin und Gamma-Globulin sich mit der Hitzedenaturierung ändert, soll kurz auf den Aufbau derselben sowie auf die chemischen Vorgänge bei der Hitzedenaturierung eingegangen werden.

a) Gamma-Globulin (3)

Das immunologisch definierte Gamma-Globulin-Molekül mit einem Molekulargewicht von 150.000 besteht aus zwei L-Ketten vom Molekulargewicht 20.000 und zwei H-Ketten vom Molekulargewicht 50.000, die durch Disulfid- und H-Brücken verknüpft sind. (7). Diese Ketten sind, wie man durch Röntgenkleinwinkelstudien an Hämoglobin und Myoglobin weiß, gefaltet. Man kennt zwei Arten von L-Ketten: Kappa und Lambda, die sich immunologisch unterscheiden (1). Ein einzelnes Molekül hat zwei H- und zwei Kappa- oder zwei H- und zwei Lambda-Ketten, niemals jedoch eine Kappa- und eine Lambda-Kette.

b) Albumin (4)

Das Molekulargewicht beträgt 69.000. Das Molekül besteht fast ausschließlich aus Peptiden, die durch

16 bis 17 S-S-Brücken stabilisiert sind. Es hat eine hohe Bindungskapazität für zahlreiche Stoffe durch seine Fähigkeit zu völlig reversiblen Strukturveränderungen, die mit dem Aufklappen von vier gleichartigen Molekülschichten bei saurem pH und durch ihr Zuklappen bei alkalischer Reaktion verglichen werden. In den Maschen dieser Struktur können verschiedenartige Substanzen festgehalten werden. Die immunchemische Analyse der Spaltstücke läßt einen Aufbau aus mindestens drei spezifischen Gruppen (A, B, C) erkennen, die durch verschiedene Enzyme etwas ungleich getrennt werden.

c) Die Hitzedenaturierung (6)

Die Vorgänge bei der Hitzedenaturierung der Proteine spielen sich in mehreren recht genau bekannten Schritten ab.

Als erster Schritt der Denaturierung ist eine Aufweitung und Volumenvermehrung der Protein-Moleküle anzusehen. Als Grundlage dieses Vorganges scheinen sich Wasserstoffbrückenbindungen zu lösen. Dabei erfordert der Aktivierungsprozeß mit einer bestimmten Aktivierungsenergie die Ruptur einer kritischen Zahl von H-Brücken, bis sich die Helixketten der Sekundärstruktur relativ frei bewegen können.

Dem Aufbrechen der H-Brückenbindungen folgt eine Hydratation der aufgebrochenen Bindungen und damit eine Ausdehnung des Moleküls.

Als nächster Schritt wird eine Trennung elektrostatischer Ladungen in der frei beweglich gewordenen Peptidkette angenommen, die Änderungen in der Bindung von Ionen zur Folge hat.

Danach läßt sich eine Aggregation von verschiedenen Molekülen annehmen. Diese führt im Endeffekt zu Flockung.

5. Bei unseren Ausgangsüberlegungen waren wir von der Fragestellung ausgegangen, wie der Organismus die Proteine aussucht, die abgebaut werden. Wenn man von der Wirksamkeit extrazellulärer Peptidasen absieht, so müßte als

erster Schritt eines Plasma-Protein-Katabolismus eine Kontaktnahme des Proteins mit der Zelle, in der der Stoffwechsel stattfindet, ablaufen. Wir untersuchten die Adsorption der Plasma-Proteine an die ja leicht zur Verfügung stehenden Erythrozyten, in der Annahme, daß die Adsorption an diese ein Bild der Adsorption an die den Proteinkatabolismus vollziehenden oder einleitenden Zellen geben könnte. Durch die Gegenüberstellung der Adsorption an Aktivkohle sollte ersehen werden, ob diese an spezifische Oberflächen gebunden ist, oder ob sie unabhängig von der vorliegenden Oberfläche ist.

Wenn wir nach den vorliegenden Ergebnissen den Versuch einer Deutung und einheitlichen Betrachtungsweise vornehmen wollen, so könnte man sagen: Die Adsorption in allen Bereichen des Albumins verhält sich bei Erythrozyten und Aktivkohle entgegengesetzt. Der nach Denaturierung erhöhten Adsorption an Erythrozyten steht auf der andern Seite ein Rückgang der Halbwertszeit gegenüber, was gut zu einer Selektion denaturierten Albumins an Zellmembranen passen würde.

Beim Gamma-Globulin stößt der Versuch einer entsprechenden Deutung auf Schwierigkeiten, da wie oben ausgeführt die Ergebnisse der Adsorptionen nicht eindeutig sind. Hier verhält sich die Adsorption an Erythrozyten und Aktivkohle eher gleichsinnig. Dem steht gegenüber die Beobachtung, daß die Halbwertszeit des Gamma-Globulins im untersuchten Bereich ansteigt. Man könnte nun unter Einschränkungen sagen, daß der Adsorptionseffekt beim Gamma-Globulin ein unspezifischer Oberflächeneffekt sei, im Gegensatz zum Albumin, das möglicherweise einer mehr spezifischen Membranbildung unterliegt. Dies würde dann die beschleunigte Abnahme der Halbwertszeit beim Albumin im Gegensatz zum Gamma-Globulin unter Denaturierungseinflüssen erklären.

6. Geht man von der rein deskriptiven Seite an die Versuchsergebnisse heran, ohne den Versuch einer Deutung geben zu wollen, so kann man sagen: Bei der stufenweisen Hitzedenaturierung von Albumin und Gamma-Globulin werden unter-

schiedliche Denaturierungsstufen mehr oder weniger zufällig geschaffen, deren Adsorptionsfähigkeiten und Verhalten im Stoffwechsel, offensichtlich in Abhängigkeit von den gesetzten Denaturierungseffekten an der Proteinstruktur, bestimmt wird. Insbesondere das Adsorptionsverhalten der denaturierten Proteine gegen Erythrozyten zeigt, daß bei zunehmender Hitzeeinwirkung offenbar vielfältige Denaturierungsstufen durchlaufen werden, wobei die Adsorption teils verbessert, teils verschlechtert wird (s. Abb. 29, 30, 31, 35, 36, 37). Dieses wellenartige Adsorptionsverhalten weist darauf hin, daß unterschiedliche Denaturierungsstufen sich hinsichtlich der Adsorptionsfähigkeit gleich verhalten. Weniger ausgeprägt läßt sich etwa ähnliches auch bei der Betrachtung des Stoffwechselverhaltens unterschiedlicher Denaturierungsstufen beobachten. Unter der molekularen Umlagerung durch Hitzeeinwirkung wird die Umsatzfähigkeit von Albumin und Gamma-Globulin im Stoffwechsel teils beschleunigt, teils verlangsamt. Unterschiedliche Denaturierungsstufen können sich demnach bezüglich der Adsorption und des Stoffwechsels gleich verhalten. Dabei muß offen bleiben, ob diesen Denaturierungsstufen gleiche oder unterschiedliche molekulare Strukturveränderungen zugrunde liegen. Andererseits sprechen aber die Beobachtungen beim Albumin dafür, daß Strukturumwandlungen mit fortschreitender Denaturierung sowohl hinsichtlich Adsorptionsfähigkeit, als auch Stoffwechselverhalten der Proteine einheitlich gerichtet sein können.

7. Der Versuch einer Deutung der erhobenen Befunde wird dadurch noch erschwert, daß im Albumin ein molekular einheitlicher Stoff in den elektrophoretisch präparierten Gamma-Globulin-Fractionen aber wohl kaum ausschließlich wenn auch überwiegend Gamma-G-Globulin untersucht wurde. Die verwendete Gamma-Globulin-Fraktion dürfte neben dem Hauptanteil von Gamma G vermutlich nicht unwesentliche Anteile an Gamma M- und Gamma A-, aber auch Beta-Globuline enthalten haben, die sich unter den Denaturierungseinflüssen sicher unterschiedlich verhalten haben.

8. Abschließend soll noch der Gedanke einer Anwendung der vorstehend geschilderten Ergebnisse zur Deutung verschiedener mit Störungen im Plasma-Protein-Stoffwechsel zusammenhängender Erkrankungen erörtert werden. In diesem Zusammenhang wäre denkbar, daß bei Krankheitszuständen, die den Eiweißstoffwechsel tangieren, z. B. bei Immunerkrankungen, molekulare Strukturänderungen der Serumproteine auftreten. Wenn es nun, was ja bei der Vielzahl der Denaturierungsstufen vorstellbar ist, auf der einen Seite zur Verlängerung der Halbwertszeit bis zur praktischen Abbauunfähigkeit durch den Organismus käme, ließen sich manche Beobachtungen, bei denen der Körper auf ungeklärte Weise Proteine speichert (z. B. Amyloid) durch diesen Effekt erklären. Im umgekehrten Falle käme es zu einem zu schnellen Abbau der Proteine, so daß die Synthese nicht mehr nachfolgen könnte und damit zur Hypoproteinaemie etwa bei Infektionskrankheiten oder malignen Neoplasien.

Zusammenfassung

Es wurde das Verhalten von ^{131}Jod -markiertem Kaninchen-Albumin und Gamma-Globulin in nativer und stufenweise Hitze-denaturierter Form in vivo in Bezug auf die Halbwertszeit dieser Proteine und in vitro in Bezug auf die Adsorption an Erythrozyten und Aktivkohle untersucht. Dabei ergab sich, daß die Halbwertszeit von Albumin nach kurzer Hitzedenaturierung länger wird und sich bei weiterer Denaturierung weit unter die Nativwerte verkürzt. In dem von uns untersuchten Bereich verhielt sich das Gamma-Globulin umgekehrt, es kam hier zu einer Verlängerung der Halbwertszeit mit zunehmender Denaturierungszeit. Bei den Adsorptionsversuchen fand sich bei Beladung von Erythrozyten und Aktivkohle mit Gamma-Globulin verschiedener Denaturierungsgrade ein wellenförmiger Verlauf der Adsorption, der wahrscheinlich durch die Inhomogenität der Gamma-Globulin-Fraktion verursacht wird. Beim Albumin kam es zu einem Anstieg der Adsorption an Erythrozyten mit zunehmender Denaturierungszeit und Denaturierungstemperatur und zu einem Abfall der Adsorption an Aktivkohle unter den gleichen Bedingungen.

Aus der Betrachtung von Adsorptions- und Stoffwechselverhalten der Proteine wurde geschlossen, daß bei zunehmender Hitzeeinwirkung offenbar vielfältiger Denaturierungsstufen getroffen werden, wobei die Adsorption teils verbessert, teils verschlechtert, die Halbwertszeit teils verlängert, teils verkürzt wird.

Der Gedanke wird erörtert, ob diese Ergebnisse verschiedene Erkrankungen, die den Eiweißstoffwechsel tangieren, erklären können.

Literaturverzeichnis

- 1) Bull.Wld. Health Org. 30. 447, (1964) : "Nomenclature for human immunoglobulin".
- 2) Eisenmenger, W. J. Med. Clin. N. America 39, 719
zitiert nach Wuhrmann, F. und Märki, W., "Dysproteinämien und Paraproteinämien", Benno Schwabe Verlag, Stuttgart 1963.
- 3) Heide, Karl, "Gamma-Globulin", Immunbiologische Inf. Behring 321 (1965)
- 4) Hitzig, W. "Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin", 125 u. 47, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg 1963.
- 5) McFarlane, A. S. "Labelling of Plasma Proteins with Radioactive Iodine", Biochem. J. 135 (1956)
- 6) Müller, H. E. "Über die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen in Abhängigkeit von ihrer Denaturierung", Med. Inauguraldissertation Mainz (1964), 20
- 7) Nisonoff, A. und Thorbecke, G. I., "Immunochemistry", Annual Review of Biochemistry 33, 355 (1965)
- 8) Sterling, K. "The Turnoverrate of Serum-albumin in men as measured by ¹³¹ Iodine tagged Albumin", J. clin. Invest 30, 1238 (1951)
- 9) "Wissenschaftliche Tabellen Geigy", 6. Auflage 249 (1960)

Lebenslauf

Am 25. März 1940 wurde ich, Gustav Georg Belz, in Wiesbaden-Biebrich als Sohn des Kaufmännischen Angestellten Franz Belz und seiner Ehefrau Lina geb. Winkler geboren.

Von 1946 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Biebrich, dann bis zum Abitur im Jahre 1960 die Naturwissenschaftliche Abteilung der Gutenberg-Schule in Wiesbaden. 1960 begann ich zum Sommersemester das Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Im Herbst 1960 leistete ich an dem Krankenhaus der Paulinenstiftung in Wiesbaden den Krankenpflegedienst ab. Im Frühjahr 1961 bestand ich in Mainz die naturwissenschaftliche Vorprüfung mit dem Urteil "sehr gut". Im Herbst 1962 legte ich dann vor dem Prüfungsausschuss in Mainz die ärztliche Vorprüfung mit "sehr gut" ab. Nach dem Physikum hörte ich ein Semester klinische Vorlesungen in Mainz. März bis April 1963 famulierte ich an einer chirurgischen Klinik in Wiesbaden. Im Sommersemester 1963 war ich bei der Johann-Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt eingeschrieben und hörte dort klinische Vorlesungen. September bis Oktober 1963 famulierte ich in der inneren Abteilung des Paulinenstiftes in Wiesbaden. Ab Wintersemester 1963 war ich dann bis zum Ende meines Studiums wieder in Mainz eingeschrieben. An der I. medizinischen Klinik begann ich im Jahre 1964 eine experimentelle Arbeit über das Stoffwechsel- und Adsorptionsverhalten der Plasmaeiweißkörper. Im März und April 1965 war ich an der gleichen Klinik auch als Famulus tätig. August 1965 bis Januar 1966 legte ich dann vor dem Prüfungsausschuß

das medizinische Staatsexamen mit dem Urteil "sehr gut" ab.

Seit Februar 1966 bin ich mit der Tochter des Landesforstmeisters Dr. Walter Pfnorr verheiratet.

Von März 1966 bis März 1967 war ich als Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Eppstein tätig, wo ich Gelegenheit hatte, eine umfangreiche Arbeit über die enterale Resorptionsquote von Proscillaridin-A anzufertigen. Ab April 1967 werde ich bis Ende des Jahres an den Chirurgischen und Gynäkologischen Abteilungen des Nordwestkrankenhauses in Frankfurt arbeiten.

